

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LE ROLE DE NOTCH1 DANS LA CROISSANCE DES VAISSEAUX SANGUINS DE L'ŒIL  
AU COURS DE LA RÉTINOPATHIE VASCULAIRE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

MAITRISE EN BIOCHIMIE

PAR

ABDOUL RAZAK SANGO

MARS 2023

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont à l'endroit de ma directrice de recherche, Dre Malika Oubaha Professeure à l'Université du Québec à Montréal, de m'avoir donné cette immense opportunité de faire mes premiers pas dans le domaine de la recherche. Elle m'a donné l'occasion de faire mes preuves avec ce projet de recherche tout en me guidant pas à pas. Elle a toujours cru en moi et m'a soutenu tout au long de la réalisation du projet malgré les difficultés rencontrées.

Je voudrais également remercier les professeures Tatiana Scorza et Diana Alison Averill d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Mes remerciements s'adressent aussi aux membres de mon laboratoire, dont Mawambo Tagne Gaelle Stephanie, Megne Ariane Vanessa, et Szubinski Amanda, pour leur aide et leur amitié. Je remercie particulièrement Elizabeth Leduc pour sa disponibilité et son assistance permanentes depuis mon arrivé au laboratoire et surtout, grand merci d'avoir accepté de corriger ce manuscrit.

Mes remerciements se concluent alors avec les membres de ma famille et mes amis, tout particulièrement à ma petite sœur Awa Sango, à ma mère et ma tendre épouse qui ont tout fait pour m'aider à traverser ces dernières années grâce à leurs nombreux encouragements et leurs soutiens. J'aimerais finir mes remerciements avec une mention spéciale à mon oncle Tiamiyu Salam Massoud qui a su être un père pour moi.

## DÉDICACE

Je dédie ce mémoire :

À mon très cher père *IN MEMORY*, j'espère que de là où tu te trouves, à travers ce modeste travail, je te rends fier. Les mots pour exprimer ma reconnaissance à ma tendre mère n'ont pas encore été inventés, je me contenterai donc d'un MERCI.

À ma chère épouse, jamais ce projet n'aura abouti sans ton soutien infallible.

MERCI.

À mon petit prince au yeux bleus, ton arrivée dans nos vies a tout chamboulé positivement.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	ii
DÉDICACE.....	iii
LISTE DES FIGURES .....	vii
LISTE DES TABLEAUX .....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	x
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS.....	xiii
RÉSUMÉ.....	xiv
ABSTRACT .....	xv
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 La vision et les rétinopathies.....	2
1.1 Anatomie et fonctionnement de l'œil.....	2
1.1.1 Développement de l'œil.....	3
1.1.2 Anatomie et physiologie de la rétine .....	4
1.1.2.1 L'angiogenèse rétinienne.....	6
1.1.2.2 Anatomie et physiologie du réseaux vasculaire hyaloïde .....	8
1.2 Les voies de signalisations impliquées dans l'angiogenèse rétinienne .....	11
1.2.1 La voie Wnt .....	12
1.2.2 La voie de signalisation Notch.....	15
1.2.3 Mécanisme général de la voie Notch .....	15
1.2.3.1 Structure des récepteurs et des ligands de Notch.....	16
1.2.3.2 Les récepteurs de Notch.....	16
1.2.3.3 Les ligands de Notch.....	16
1.2.2 Signalisation Notch.....	18
19	
1.2.2.1.1 Implication de la voie de Notch dans le développement embryonnaire .....	19
1.2.2.1.2 Notch dans le développement pathologique .....	20
1.2.2.2 Modulation de l'interaction récepteur-ligand .....	21
1.2.2.3 Translocation du NICD et activation des effecteurs .....	22
1.3 La sénescence cellulaire.....	23
1.3.1 Mécanisme de la sénescence cellulaire.....	23
1.3.2 Rôles de la sénescence .....	25
1.3.2.1 Rôle bénéfique de la sénescence.....	26
1.3.2.2 Rôle de la sénescence dans différentes pathologies.....	29
1.4 Les maladies des yeux.....	30

1.4.1	Les vitrorétinopathies.....	30
1.4.1.1	Les vitreo-rétinopathies exsudatives familiales (FEVR).....	31
1.4.1.2	Maladie de Norrie.....	31
1.4.1.3	Maladie de Coast.....	32
1.4.1.4	Vitrée primaire hyperplastique persistant (PHPV).....	32
1.4.1.5	Traitement des vitrorétinopathies.....	33
1.5	Rationnel de l'étude.....	33
1.6	Hypothèse.....	34
1.7	Objectifs.....	34
CHAPITRE 2 Matériels et méthodes.....		35
2.1	Animaux.....	35
2.1.1	Traitement au tamoxifène.....	35
2.1.2	Génotypage et sexage.....	36
2.1.3	Prélèvement des différents tissus.....	36
2.1.3.1	Prélèvement des yeux post-nataux pour l'immunofluorescence.....	36
2.1.3.2	Prélèvement des yeux prénataux pour l'immunofluorescence.....	36
2.1.3.3	Prélèvement des rétines pour la protéinémie.....	37
2.1.3.4	Prélèvement des hyaloïdes.....	37
2.1.4	Immunofluorescence.....	37
2.1.4.1	Rétine.....	37
2.1.4.2	Vaisseaux hyaloïdes.....	38
2.1.5	Test de prolifération.....	39
2.1.6	Analyse par cytométrie en flux.....	39
2.1.7	Isolation de l'ARN et PCR quantitative à temps réel.....	39
2.1.8	Culture cellulaire.....	41
2.1.8.1	Fibroblastes.....	41
2.1.8.2	Cellules endothéliales aortiques humaines (HAEC).....	42
2.1.8.3	Cellules endothéliales de la veine ombilicale Human Umbilicale humaine (HUVEC).....	42
2.1.9	Western Blot.....	43
2.1.10	Marquage à la x-galactosidase.....	44
2.1.10.1	Rétine.....	44
2.1.11	Analyses statistiques.....	45
CHAPITRE 3 Résultats.....		46
3.1	Régression du réseau vasculaire des hyaloïdes chez la souris.....	46
3.2	Sénescence et régression vasculaire chez la souris.....	48
3.3	Modèle murin.....	51
3.4	L'inhibition de la voie de signalisation Notch1 entraîne une persistance anormale des hyaloïdes.....	52
3.5	Délétion de Notch1 et expression de la sénescence dans les vaisseaux hyaloïdes.....	56
3.6	Persistance, prolifération et apoptose.....	58
3.7	Notch1 et sénescence des cellules fibroblastiques embryonnaires.....	62
3.8	Notch1 et sénescence des cellules endothéliales humaines.....	65

CHAPITRE 4 Discussion.....	70
4.1 Régression du réseau vasculaire des hyaloïdes chez la souris .....	70
4.2 L'inhibition de la voie de signalisation Notch1 entraîne une persistance anormale des vaisseaux hyaloïdes.....	72
4.3 Délétion de Notch1 entraîne un défaut de vascularisation de la rétine .....	73
4.4 Délétion de Notch1 et expression de la sénescence dans les vaisseaux hyaloïdes.....	74
4.5 Persistance, prolifération et apoptose.....	75
4.6 Notch1 et expression de la sénescence cellulaire induite par variation d'oxygène.....	76
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	80
ANNEXE A Dommage à l'ADN .....	82
ANNEXE B Marquage SA- $\beta$ -Galactosidase HAEC hypoxie .....	83
ANNEXE C Marquage SA- $\beta$ -Galactosidase HUVEC hypoxie .....	84
ANNEXE E Marquage SA- $\beta$ -Galactosidase de fibroblastes embryonnaires exposés à l'hypoxie .....	85
ANNEXE F Régression des vaisseaux hyaloïdes après P8.....	86
BIBLIOGRAPHIE .....	87

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Coupe transversale montrant les différentes parties de l'œil humain. ....	3
Figure 1.2 : Développement de l'œil chez les vertébrés.....	3
Figure 1.3 :Image illustrative de l'œil. ....	5
Figure 1.4 : Initiation du développement du réseau vasculaire rétinien chez la souris .....	7
Figure 1.5 : Images microscopiques montrant des vaisseaux rétiniens guidés par les cellules de pointe (tip cells) chez la souris.....	7
Figure 1.6 : Illustration de la régression physiologique des hyaloïdes et développement des vaisseaux rétiniens définitifs chez la souris. ....	9
Figure 1.7 : Interaction entre VEGF et la signalisation Notch1-Dll4 au cours de la croissance des vaisseaux sanguins. ....	12
Figure 1.8 : Signalisation canonique de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. ....	13
Figure 1.9 : Interaction de la voie Wnt et Notch dans l'angiogenèse rétinienne.....	15
Figure 1.10 : Schéma représentant les récepteurs de Notch. ....	17
Figure 1.11 : Schéma représentant les ligands de Notch.....	17
Figure 1.12 : La voie de signalisation NOTCH.....	19
Figure 1.13 : Télomères et sénescence répllicative. ....	24
Figure 1.14 : Mécanisme moléculaire de la sénescence causée par de dommages à l'ADN. ....	26
Figure 1.15 : Réhabilitation d'un tissu par le processus de sénescence. ....	28
Figure 1.16 : Manifestations cliniques. ....	32
Figure 2.1 : Procédure d'injection au tamoxifène et technique de dissection de la rétine et des hyaloïdes.	38
Figure 3.1 : Régression des vaisseaux hyaloïdes durant développement pré et postnatal.....	48
Figure 3.2 : Schémas illustratifs de l'expression de la SA- $\beta$ -Gal dans les vaisseaux hyaloïdes. ....	49
Figure 3.3 : Expression des marqueurs clés de la sénescence par Immunoblot et RT-qPCR de Notch1 et des marqueurs de sénescence dans des lysats de hyaloïdes. ....	51
Figure 3.4 : Modèle animal. ....	52
Figure 3.5 : Phénotype de persistance des vaisseaux hyaloïde à P8.....	53

Figure 3.6 : Développement anormal des vaisseaux rétiniens à P8 chez la souris.....	56
Figure 3.7 : Expression de Notch1 et des marqueurs de sénescence.....	58
Figure 3.8 : Suivie de la prolifération cellulaire des cellules vasculaires hyaloïdes. ....	59
Figure 3.9 : Évaluation des cellules apoptotiques dans les vaisseaux hyaloïdes (P8) par cytométrie en flux. .....	61
Figure 3.10 : Immunomarquage d 'Iba1.....	62
Figure 3.11 : Sénescence des cellules fibroblastes embryonnaires exposées à l'hyperoxie (75%O <sub>2</sub> ).....	64
Figure 3.12 : Expression de la sénescence au niveau des cellules humaines d'origine artérielle (HAEC) exposées à l'hyperoxie (75 % O <sub>2</sub> ). ....	67
Figure 3.13 : Expression de la sénescence avec des cellules humaines d'origine artérielle (HUVEC) exposées à l'hyperoxie (75% O <sub>2</sub> ). ....	69
Figure supplémentaire 4.1 : Immunomarquage anti- $\gamma$ -H2AX.....	82
Figure supplémentaire 4.2 : Expression de la sénescence avec des cellules humaines d'origine artérielle (HAEC) exposées à l'hypoxie (3% O <sub>2</sub> ). ....	83
Figure supplémentaire 4.3 : Expression de la sénescence avec des cellules humaines d'origine veineuse (HUVEC) exposées à l'hypoxie (3 % O <sub>2</sub> ). ....	84
Figure supplémentaire 4.4 : Expression de la sénescence avec des fibroblastes embryonnaires exposées à l'hypoxie (3% O <sub>2</sub> ).....	85
Figure supplémentaire 4.5 : Illustration de la régression postnatale des vaisseaux hyaloïdes P14, P21.....	86

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Tableau des oligonucléotides utilisés pour les réactifs de RT-qPCR d'origine murine .....	40
Tableau 2.2 : Fournisseur, les numéros de catalogue et les séquences d'amorces pour les gènes d'origine humaine utilisés. ....	41
Tableau 2.3 : Tableau montrant la compagnie, nature et les numéros de catalogue des anticorps utilisés.....	44

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

Aa : acides aminés

ADAM : A disintegrin and metalloprotease

ADN : Acide désoxyribonucléique

APC : Adénomatose Polypose coli

ANK: Ankyrine

AMIR: micro-vascularisation intra-rétinienne

ARN : acide ribonucléique

CK1 : caséine kinase 1a

cKO : conditional Knock-Out

CSCN : système nerveux central

CSL : CBF1-Su-Lag1

CXCR4 : Motif Chemokine Receptor 4

DAPT : (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester)

Dll4 : DELTA-LIKE

DMLA : La dégénérescence maculaire liée à l'âge

DSL : Delta/Serra/Lag-2

EdU : 5-ethynyl-2'-deoxyuridine

EGFL : Epidermal Growth Factor Like

FEVR : Vitréorétinopathie exsudative familiale

FGFR : Fibrosblast Growth Factor Receptor

Fzd1 : Frizzled1

Fzd2 : Frizzled2

Fzd7 : Frizzled7

FZD4 : Frizzled4

GSK3 : glycogène synthase kinase 3

HA : Hyaloid artera

H1 : hairy and enhancer of split-1

HIF : Hypoxia inducible factor

HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cell

HAEC : Human Aortical Endothelial Cell

IBa1 : Ionized calcium-binding adapter molecule 1

Jag : JAGGED

KDa : Kilo Dalton

LEF : lymphoid enhancer factor

LAL-T : Lymphoblastique de type

Lrp5/6 : Lipoprotein Receptor-related Protein 5/6

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinases

NICD: Notch Intracellular Domain

NDP : Norrie disease protein

NEXT : Domaine extracellulaire de Notch

NLS : Nuclear Localisation Signal

NRR : Notch Related regions

PDGF-AA : Platelet-derived growth factor

PHPV: vitrés primitifs hyperplasiques persistants

PFV : vascularisation fœtale persistant

PI : Iodure de Propidium

PM : pupillary membrane

PBS : solution saline tamponnée au phosphate

PFA : paraformaldéhyde

pRb : retinoblastoma protein

RAM : RBP-J Kappa-Associated Module

RVEF : vitré rétinopathie exsudative familiale

RDNP : rétinopathie diabétique non proliférative

RDP : rétinopathie diabétique proliférative

RPE : épithélium pigmentaire rétinien

SASP : phénotype sécrétoire associé à la sénescence

TAD : Transactivation Domain

TVL : Tunica vasculosa lentis

TSPAN12 : Tétraspaline 12

TCF : T-cell factor

TGF- $\beta$  : transforming growth factor  $\beta$

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VE-cadhérine : Vascular Endothelial-cadhérine

VHP : Vasa hyaloïde propria

## LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

E18.5 : Embryon 18.5 jours de conception

P0 : Jour postnatal 0, Jour de naissance

P4 : Jour postnatal 4

P8 : Jours postnatal 8

P14 : Jour postnatal 14

P21 : Jour postnatal 21

H : Heure

Min : minutes

mL : millilitres

mM : millimolaire

Norm : Normoxie

O<sub>2</sub>-75% : Hyperoxie (75% d'oxygène)

O<sub>2</sub>-3% : Hypoxie (3% d'oxygène)

## RÉSUMÉ

Les vaisseaux sanguins fœtaux transitoires (hyaloïdes) forment un réseau vasculaire embryonnaire qui assure l'apport des métabolites et de l'oxygène à la rétine en développement. Chez l'humain, ces vaisseaux hyaloïdes régressent complètement vers la fin de la grossesse, à la 36<sup>e</sup> semaine de gestations, mais chez la souris, la régression commence après la naissance. À mesure que les vaisseaux hyaloïdes régressent progressivement, les vaisseaux sanguins de la rétine se forment simultanément. Lorsque ce processus physiologique est perturbé, une persistance anormale des vaisseaux hyaloïdes est entraînée, conduisant à plusieurs maladies oculaires rares, dont la persistance des vaisseaux fœtaux (PFV). Les voies cruciales liées au développement vasculaire sont étroitement régulées par Notch1 qui est un récepteur transmembranaire connu pour son rôle de régulateur essentiel de l'angiogenèse, de la différenciation vasculaire et de l'intégrité vasculaire. Cependant, son rôle dans la régression vasculaire est inconnu. En utilisant la souris comme modèle d'étude, nous avons montré que Notch1 est fortement exprimé dès les premiers stades de développement des vaisseaux hyaloïdes. Nous avons également révélé, pour la première fois, l'expression de la sénescence dans la régression vasculaire de ces vaisseaux hyaloïdes. Par la suite, nous avons montré qu'une délétion conditionnelle et spécifique de Notch1 dans les cellules endothéliales de vaisseaux sanguins de l'œil affecte la régression vasculaire causant une persistance anormale des vaisseaux. Afin de trouver une explication à cette persistance vasculaire, le marquage à la SA- $\beta$ -Galactosidase a montré une expression relativement similaire dans les vaisseaux hyaloïdes chez les souris knock-out (Notch1<sup>ckO</sup>) et Wild-type (Notch1<sup>fl/fl</sup>). Cependant, la cytométrie en flux a révélé une faible présence de cellules apoptotiques dans les souris Notch1<sup>ckO</sup>. L'étude de la prolifération par marquage à l'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine), a montré plus de cellules prolifératives chez les souris Notch1<sup>ckO</sup>. Finalement, afin d'élucider l'implication de Notch1 dans le mécanisme de la sénescence, le marquage de la SA-B- $\beta$ -Galactosidase et l'expression géniques de Notch1, des marqueurs clés de la sénescence dans trois types cellulaires indiquent que Notch1 régule très probablement la sénescence cellulaire.

**Mots clés :** Développement vasculaire, persistance des vaisseaux foetaux (FEV), rétinopathie, hyaloïdes, Notch1, régression vasculaire, sénescence.

## ABSTRACT

Transient fetal blood (hyaloid) vessels are an embryonic vascular system that delivers metabolites and oxygen to the developing retina. In humans, these hyaloids regress completely towards the end of pregnancy at 36 weeks. However, in mice, regression begins after birth. While the hyaloid vessels gradually regress, the blood vessels of the retina form simultaneously. When this physiological process is disrupted, it leads to abnormal persistence of hyaloid vessels causing several rare eye diseases including Persistence of Fetal Vessels (PFV). Critical pathways related to vascular development are closely regulated to Notch1 which is a transmembrane receptor known to be a key regulator of angiogenesis, vascular differentiation, and vascular integrity. However, its role in vascular regression is unknown. Therefore, using the mouse as a study model, we showed that Notch1 is highly expressed early, at the first stages of hyaloid vessel development. We also revealed for the first time the expression of senescence in the vascular regression of these hyaloid vessels. Subsequently, we showed that a conditional and specific deletion of Notch1 in endothelial cells of the eye's blood vessels affects vascular regression causing their abnormal persistence. To find an explanation for this vascular persistence, SA- $\beta$ -Galactosidase labeling showed relatively similar expression in hyaloid vessels between knock-out (Notch1<sup>CKO</sup>) and wild-type (Notch1<sup>fl/fl</sup>) mice. However, flow cytometry data revealed a low presence of apoptotic cells in Notch1<sup>CKO</sup> mice. An EdU incorporation assay to analyse cell proliferation showed more proliferative cells in Notch1<sup>CKO</sup> mice. Finally, to elucidate the involvement of Notch1 in the mechanism of senescence, SA- $\beta$ -Galactosidase labeling, and gene expression of Notch1, key senescence markers in three cell types suggested that Notch1 would regulate cellular senescence.

Keywords: Vascular development, persistent fetal vasculature in human (PFV), retinopathy, hyaloids, Notch1, vasculars regression, senescence.

## INTRODUCTION

L'œil est un organe central, qui fait partie du système nerveux sensoriel. L'œil réagit à la lumière visible et permet de relayer l'information visuelle au cerveau à travers le nerf optique. Il est le miroir de nos émotions et de nos pensées. Son importance se mesure lorsque nous nous retrouvons debout dans notre chambre bien éclairée et que soudain, il y a un délestage d'électricité. Tout devient sombre, dans le noir absolu et on reste figé sur notre position sans repères. Cet exemple vient décrire une réalité que vit un grand nombre de personnes à travers le monde. C'est-à-dire les personnes qui souffrent de déficits visuels ou de cécité. Selon le dernier rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2019), plus de 2,2 milliards de personnes souffriraient de problème visuel (OMS, 2019). Au Canada, selon un récent rapport publié par le Conseil Canadien des Aveugles (CCA); en 2019, environ 3,2% de la population canadienne (soit 1,2 million de personnes) vit avec un problème de vision (non voyant ou malvoyant) (Aveugles; CCA), 2021). Selon le même rapport, près de 8 millions de Canadiens souffriraient de maladies pouvant engendrer la perte de la vue. En 2017, une étude sur la prévalence de la perte de vision par province, classe l'Ontario en tête de liste avec environ 466000, personnes souffrant d'une perte de vision. Le Québec vient en deuxième position avec 284 000 individus affectés (Aveugles; CCA), 2021). Ces statistiques révèlent que la perte de la vision, laquelle altère la qualité de vie des individus affectés et de leurs entourages, constitue un réel problème de santé publique. Plusieurs maladies connues sont responsables de la perte de la vision, parmi lesquelles se retrouvent la cataracte qui touche la grande majorité des personnes âgées, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), le glaucome et les rétinopathies diabétiques. Alors que ces maladies sont réputées et bénéficient d'une certaine prise en charge, d'autres sont moins populaires et touchent majoritairement la population juvénile (Promelle et Milazzo, 2017). Il s'agit de la famille des rétinopathies rares telles que la maladie de Norrie, les vitrés primitifs hyperplasiques persistants (PHPV), la vitrée rétinopathie exsudative familiale (RVEF) et la rétinopathie du prématuré (Balmer, A *et al.*, 2005; Daruich *et al.*, 2020). Ces maladies sont des affections rares qui touchent moins d'une personne sur 2000. Ces rétinopathies sont généralement caractérisées par un défaut de formation des vaisseaux sanguins rétiniens susceptibles d'entraîner une cécité.

# CHAPITRE 1

## La vision et les rétinopathies

### 1.1 Anatomie et fonctionnement de l'œil

L'œil est l'organe de la vision par lequel notre cerveau analyse et interprète tout ce que nous observons. Il est principalement constitué de trois couches appelées tuniques.

La tunique fibreuse est la couche externe de l'œil et se compose de la sclère (ou sclérotique) qui représente le blanc de l'œil (enveloppe protectrice du globe oculaire), et de la cornée, qui correspond à la membrane transparente bombée positionnée à l'avant de l'œil. La cornée cache la pupille et l'iris et permet la déviation (réfraction) de la lumière qui entre dans l'œil. La tunique uvéale est la couche moyenne. Elle est composée de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques regroupant l'iris, la choroïde et le corps ciliaire. La tunique nerveuse est la couche la plus interne de l'œil. Elle est principalement composée de la rétine très vascularisée et directement en rapport avec l'humeur vitrée (Figure 1.1). Ensemble, ils forment la partie postérieure de l'œil (Friedlander, 2007). En plus de ces différentes structures, s'ajoutent les structures annexes de l'œil telles que les paupières qui recouvrent et protègent l'œil ; la conjonctive qui lubrifie le globe oculaire et la glande lacrymale et les larmes, qui aident à prévenir les infections (Lagrange, 1893).

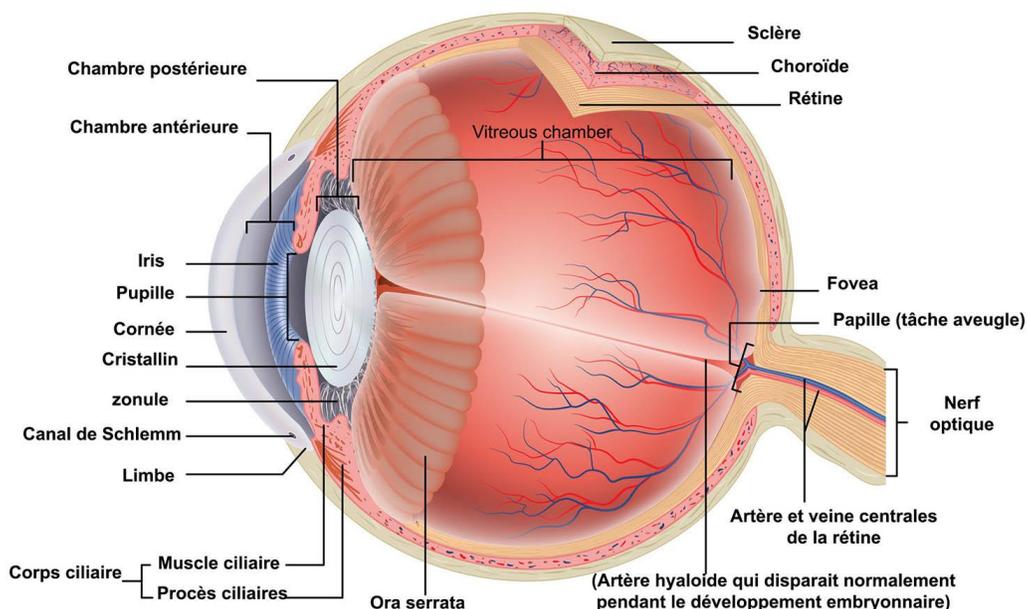


Figure 1.1 : Coupe transversale montrant les différentes parties de l'œil humain.

<https://www.visiopoledubeaujolais.com/anatomie-oeil/>

### 1.1.1 Développement de l'œil

Le développement de l'œil commence très tôt lors de l'embryogenèse. L'œil étant une expansion du cerveau, son développement embryonnaire se fait parallèlement à celui du système nerveux. Ainsi, chez l'humain, la genèse de l'œil commence dès la fécondation jusqu'à la fin de la troisième semaine de gestation. L'organogénèse débute à la quatrième semaine jusqu'à la fin de la huitième semaine de gestation. La phase de différenciation commence au premier trimestre de gestation.

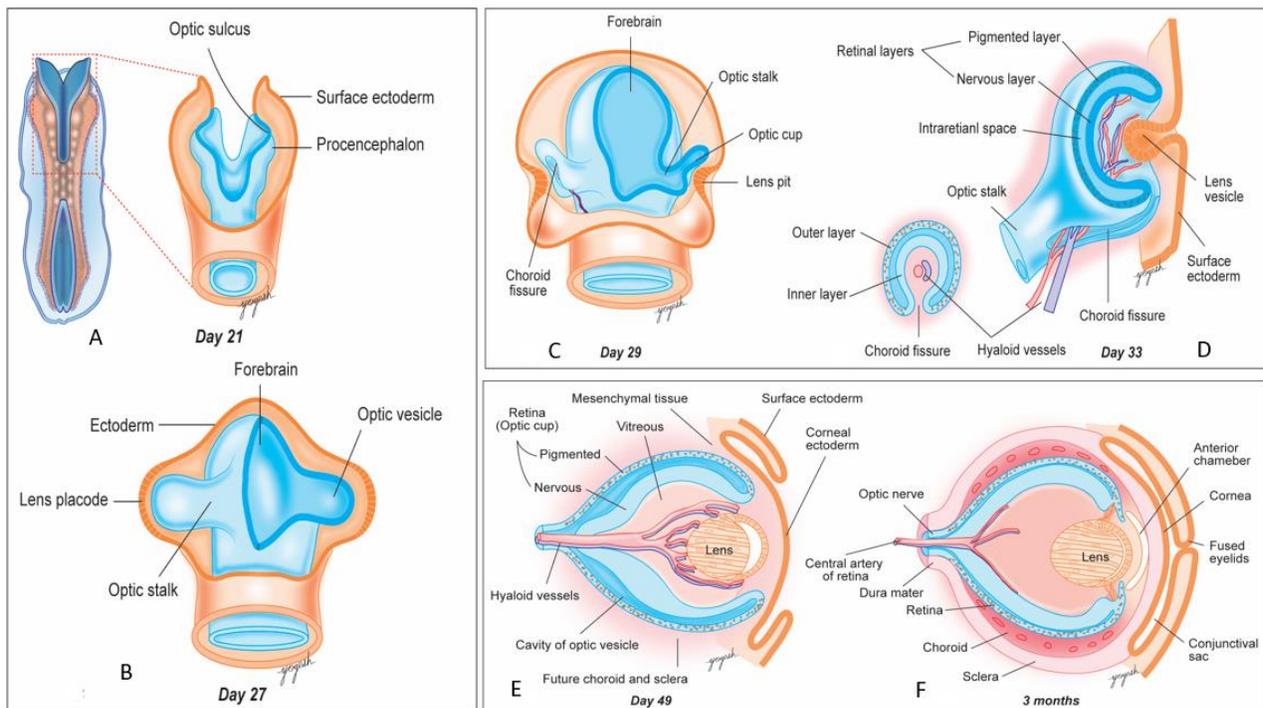


Figure 1.2 : Développement de l'œil chez les vertébrés.

- (a) Formation du sillon optique. (b) Élaboration de la vésicule optique. (c) Formation de la cupule optique et de la fissure choroïdienne. (d) Mise en place du nerf optique. (e, f) Formation des différentes couches vasculaires rétiniennes (Sontakke, 2021).

Chez les vertébrés, la formation de l'œil suit un processus très complexe nécessitant plusieurs étapes. Chez l'humain, dès le 22<sup>e</sup> jour après la fécondation, l'épaississement et la dépression du

diencéphale permettent la formation du sillon optique indiquant le début de la formation de l'organe de la vision (Figure 1.2A). Le sillon optique s'invagine en formant un renflement. C'est la vésicule optique (Figure 1.2B). Le développement de la vésicule optique donne naissance à la tige optique (Figure 1.2B). Le contact entre la vésicule optique et l'ectoderme de surface permet la formation de la placode de la lentille (Figure 1.2B). La cupule optique se forme au 33<sup>e</sup> jour grâce à l'invagination de la vésicule de la lentille (Figure 1.2D). Les bords de la cupule optique subissent une déformation qui permet de recouvrir la vésicule du cristallin à la sixième semaine de gestation, en laissant un espace appelé fissure choroïdienne ou fissure fœtale (Figure 1.2C). Cette fissure laisse un interstice où entre le système vasculaire hyaloïde en développement et aussi d'où s'échappent les axones des cellules ganglionnaires rétiniennes, qui s'associent pour former le nerf optique (Bernstein et al., 2018) (Figure 1.2D). Les vaisseaux hyaloïdes se développent et apportent les nutriments à la vésicule optique, au cristallin et à la rétine (Figure 1.2D). Tandis que la partie distale des vaisseaux hyaloïdes régresse (Figure 1.2F) graduellement, les parties proximales de la rétine se forment entraînant la formation de la première couche de la rétine (Figures 1.2E, F) à la fin de la 12<sup>e</sup> semaine. À ce stade de développement, les éléments essentiels pour une bonne vision du globe oculaire sont en pleine croissance. C'est le cas de la choroïde, de la rétine, des hyaloïdes et de l'humeur vitrée (Creuzet et Etchevers, 2017; Duparc, 2005; Redslob, 1932).

### **1.1.2 Anatomie et physiologie de la rétine**

La rétine est composée de trois couches nucléaires et de deux couches plexiformes. De l'extérieur vers l'intérieur, se trouvent la couche externe de la rétine constituée de l'épithélium pigmentaire rétinien (Storer *et al.*), puis la couche nucléaire externe (ONL), formée des photorécepteurs photosensibles en forme de tiges (bâtonnets) et de cônes qui interagissent avec la couche plexiforme externe (OPL) (Figure 1.3). La couche nucléaire interne (INL) constituée des cellules gliales bipolaires, des cellules horizontales, des cellules amacrinées et des cellules de Müller. La couche plexiforme interne (IPL) communique avec l'INL par le biais des cellules bipolaires et amacrines (Figure 1.3). Finalement, la région la plus interne de la rétine est composée de la couche de cellules ganglionnaires (GCL) dont l'ensemble des axones s'organisent à l'extérieur de la rétine formant le nerf optique. Le nerf optique joue le rôle de la transmission du flux nerveux entre l'œil et le cerveau (Figure 1.3). En effet, au niveau de la rétine, l'influx nerveux est perçu et modulé par les cellules neuronales telles que les cônes, les bâtonnets, les cellules bipolaires, les cellules

ganglionnaires, les cellules amacrinées et les cellules horizontales permettent la transduction (Kolb *et al.*, 2019). Cet influx nerveux est par les photorécepteurs et transmis en message électrochimique au système nerveux central via le nerf optique (Kolb *et al.*, 2019).

Les cellules gliales de Müller jouent le rôle de maintien de l'architecture rétinienne et apportent les éléments nécessaires au maintien de l'homéostasie (Newman et Reichenbach, 1996 ; Tsang et Sharma, 2018). Les microglies représentent la population de cellules immunitaire de la rétine.

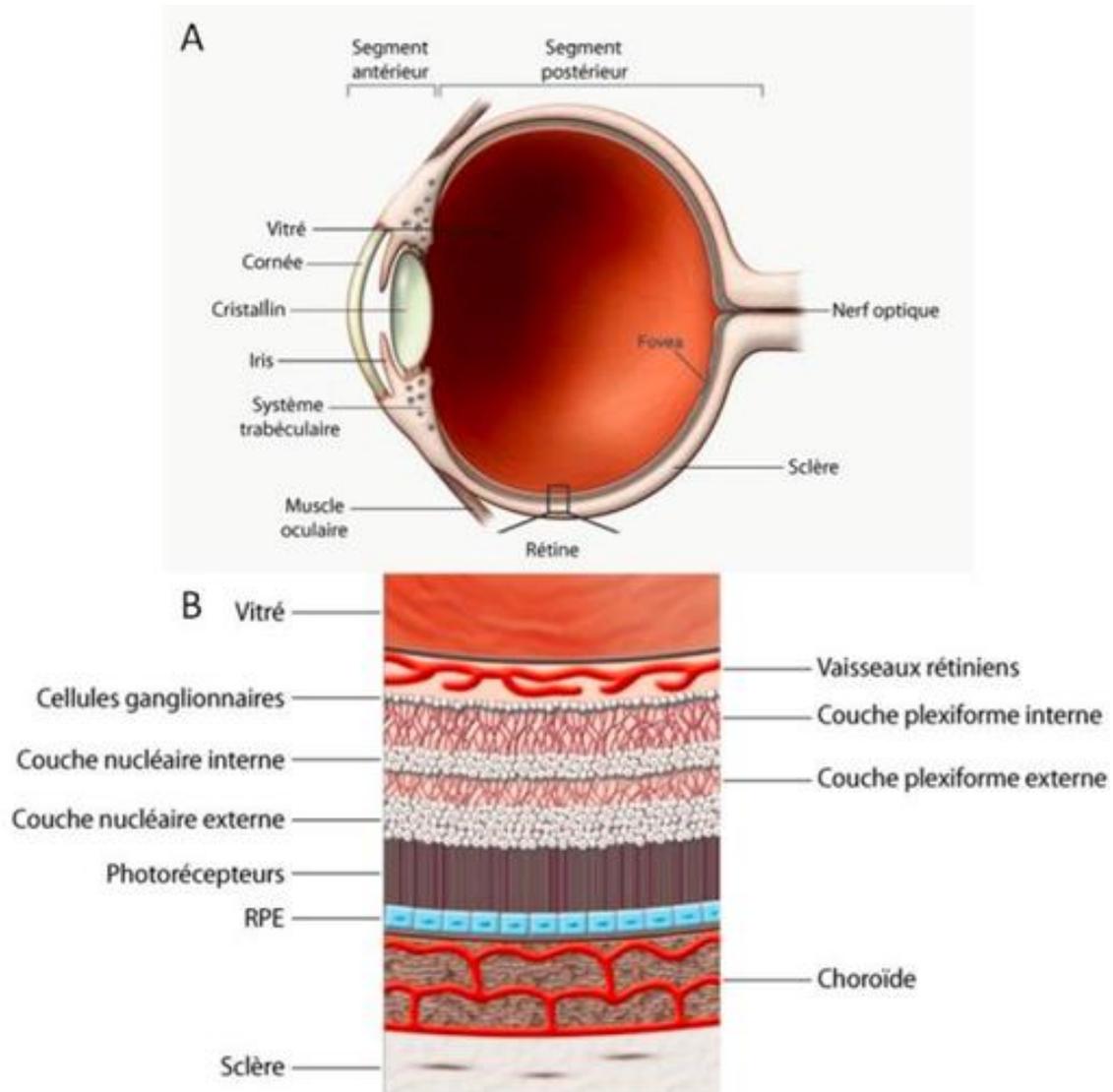


Figure 1.3 :Image illustrative de l'œil.

(A) Anatomie de l'œil (B) Section de rétine montrant les cellules neuronales, les cellules gliales et un important réseau vasculaire (Friedlander, 2007).

Elles jouent un rôle similaire à celui des macrophages. Ce sont les principaux producteurs de facteurs pro-inflammatoires (cytokines), de certaines enzymes (lipase, peptidase) et de radicaux libres (Hypochlorite, fer) (Colton et Gilbert, 1987).

### **1.1.2.1 L'angiogenèse rétinienne**

L'angiogenèse est le processus par lequel de nouveaux vaisseaux se forment à partir de vaisseaux préexistants (Adams et Alitalo, 2007). Ce processus permet de remodeler le plexus vasculaire primitif mis en place pendant la vasculogénèse afin de former un réseau vasculaire rétinien définitif (Beaudry-Richard, 2019). La vasculogénèse, quant à elle, est le processus qui permet la mise en place de nouveaux vaisseaux par l'organisation de cellules vasculaires progénitrices qui se différencient et s'accumulent pour former un tube endothélial précoce (Beaudry-Richard, 2019).

Au cours du développement embryonnaire, les cellules neuronales migrent du nerf optique vers la périphérie (Figure 1.4). Cette migration nécessite l'apporté continuellement d'oxygène assuré par les astrocytes. Le manque d'oxygène initie la formation du réseau vasculaire par vasculogénèse sur lequel les cellules endothéliales s'agrippent pour migrer (Figure 1.4). L'ensemble de ce processus mène à la formation de la couche superficielle qui constitue la première couche vasculaire de la rétine (Figure 1.4) (Friedlander, 2007). Les deux autres couches vasculaires (intermédiaire et profonde) qui se forment par angiogenèse est régulée par le « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF) produit par les cellules endothéliales. La production de VEGF est stimulée par le facteur de transcription HIF-1 (Facteur inducible à l'hypoxie). En effet, une carence en oxygène entraîne la production de HIF-1 (Figure 1.4). L'augmentation des niveaux d'HIF-1 stimule une hausse de la sécrétion du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (Robinson *et al.*, 2006). L'interaction entre HIF-1 et VEGF est une étape importante de l'angiogenèse. Selon le niveau

d'expression de HIF-1 et du VEGF, on peut assister à une modification, croissance, arrêt ou régression des vaisseaux sanguins (Rattner *et al.*, 2019).

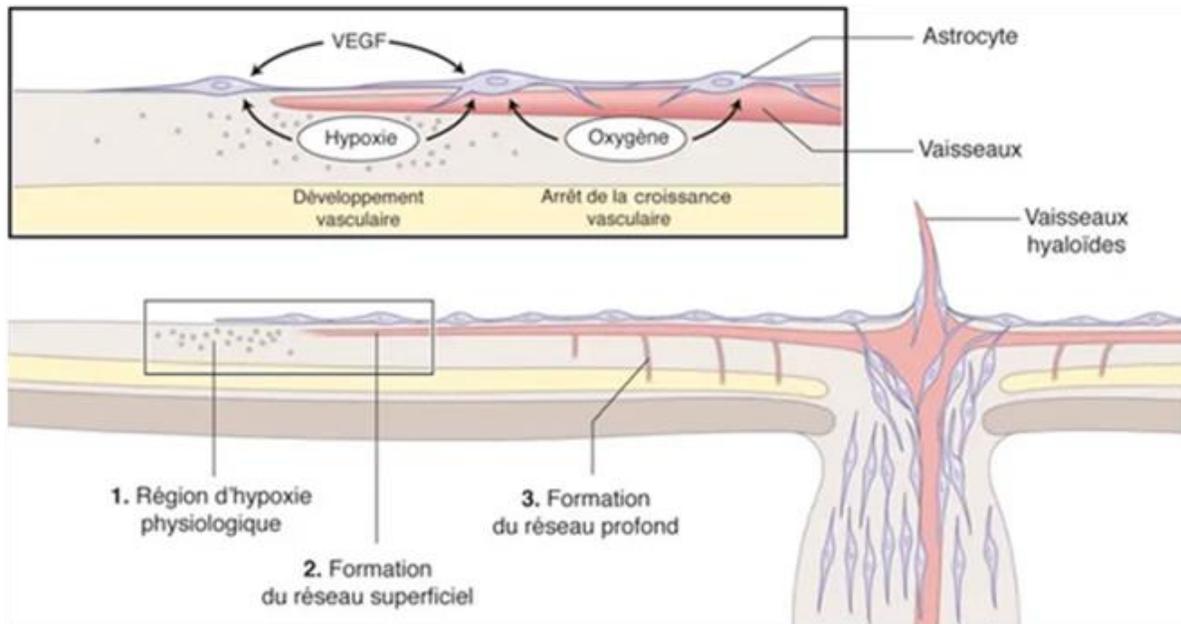


Figure 1.4 : Initiation du développement du réseau vasculaire rétinien chez la souris (General, 2017).

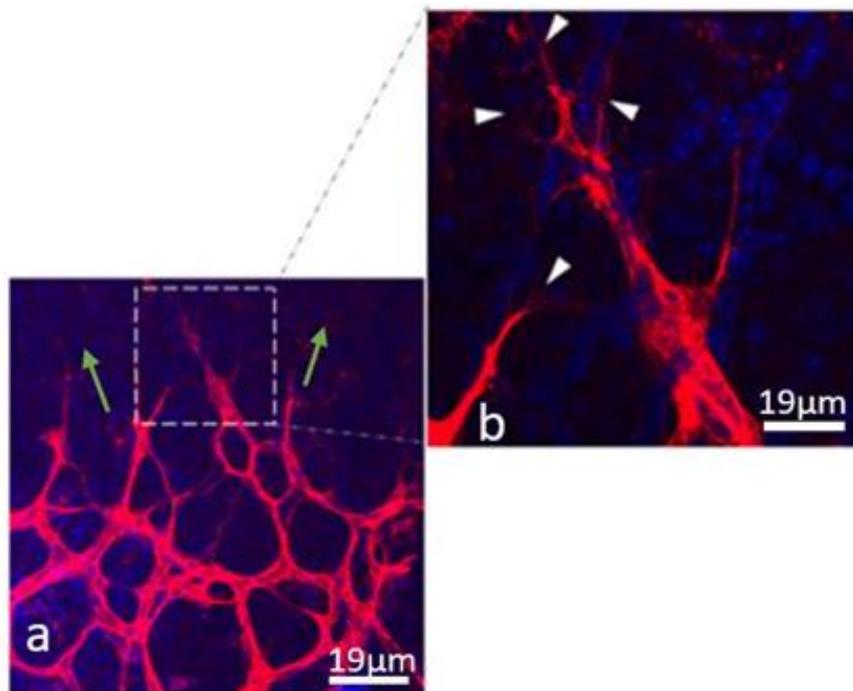


Figure 1.5 : Images microscopiques montrant des vaisseaux rétiens guidés par les cellules de pointe (tip cells) chez la souris. Les flèches vertes désignent le sens de croissance des vaisseaux rétiens. (b)Agrandissement de stalk cells et de tip cells montrant les filopodes en flèches blanches. Grossissement 60x.

De façon générale, chez les mammifères, la rétine en développement est alimentée par un réseau vasculaire composé de trois couches : superficielle, intermédiaire et profonde (Liu. *et al.*, 2017). Chez l'humain, la vascularisation rétinienne débute à la 16<sup>ème</sup> semaine de gestation et atteint sa maturation vers la 40<sup>ème</sup> semaine (Liu. *et al.*, 2017). Contrairement à l'Homme, chez la souris, la première couche (superficielle) de la rétine est mise en place dès la première semaine après la naissance (Tata. *et al.*, 2015). La deuxième couche (couche profonde) se forme suivant la migration dirigée et guidée des vaisseaux par les cellules de pointe (Tip cells) (Figures 1.4, 1.5a, b). Les cellules de pointes à la différence des cellules de soutien (stalk cells) sont guidées par les filopodes (Figure 1.5b). Ces filopodes s'étendent vers la couche extérieure en plongeant dans la rétine interne grâce à leurs filopodes formant la couche profonde puis la couche intermédiaire (Figures 5 et 6) (Liu et al., 2017).

### **1.1.2.2 Anatomie et physiologie du réseaux vasculaire hyaloïde**

Chez les humains, la formation du réseau vasculaire hyaloïde se passe en grande partie au cours de la vie utérine. Cependant, chez la souris, la formation des vaisseaux hyaloïdes commence au jour embryonnaire 10.5 (E10.5). Trois jours plus tard, la formation des vaisseaux hyaloïdes est complète et ces vaisseaux alimentent déjà le cristallin et la rétine en développement ainsi que le vitré primaire (Kishimoto et al., 2018). Après la naissance, on assiste à une régression physiologique des hyaloïdes et à une formation séquentielle des vaisseaux rétiniens définitifs, processus qui s'effectuent simultanément (Figure 1.6). Ce sont les « vasa hyaloïdia propria » (VHP) et « Tunica vasculosa lentis » (TVL) qui commencent à disparaître en grande partie dès la première semaine après la naissance (Figure 1.6) (P8) ; parallèlement, au P0, la rétine immature finalise la formation de la première couche vasculaire rétinienne (couche superficielle) à P7. Après deux semaines,

tandis qu'on assiste à la disparition quasi complète de la membrane pupillaire (PM), on assiste

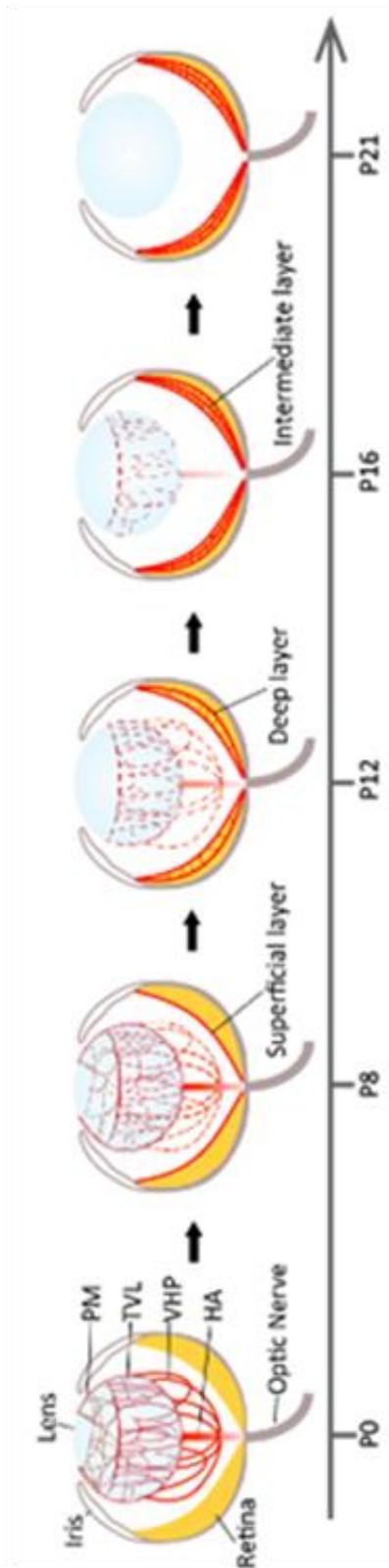


Figure 1.6 : Illustration de la régression physiologique des hyaloïdes et développement des vaisseaux rétinien définitifs chez la souris.

Vaisseaux hyaloïdes très dense à la naissance et rétine avasculaire (P0). Régression de la vasa hyaloïdia propria (VHP) et formation de la couche superficielle (P8). Présence rare de vaisseaux hyaloïdes et formation de la couche profonde et intermédiaire respectivement à P16 et à P21. Absence de vaisseaux hyaloïdes (P21) (Wang *et al.*, 2019).

également à la formation de la deuxième couche rétinienne (couche profonde) et il ne reste plus que de rares vaisseaux tenus par l'artère hyaloïde (HA) et soutenue par le nerf optique (Figure 1.6), (P16). À la troisième semaine (jour postnatal (21), les vaisseaux hyaloïdes ont complètement régressé et la rétine devient mature avec la formation complète de la troisième couche (couche intermédiaire) (Figure 1.6) (Z. Wang. *et al.*, 2019).

La voie Wnt joue un rôle très important dans l'angiogenèse rétinienne, notamment la différenciation, la migration et la prolifération. Elle participe également au processus d'apoptose décrit lors de la régression développementale des hyaloïdes (Palpant. *et al.*, 2007; Speese & Budnik, 2007). Il a été démontré que les cellules endothéliales expriment des protéines Wnt qui régulent l'angiogenèse physiologique ou pathologique (ischémique) (Leroux *et al.*, 2010). Le rôle de la voie Wnt est surtout déterminant lors de l'angiogenèse postnatale de la rétine. En effet, une récente étude a démontré que la mutation des récepteurs «norrie disease protein» (NDP), frizzled4 (FZD4) et «lipoprotein receptor-related protein 5» (LRP5) entraîne un grave défaut de vascularisation de la rétine (Kato *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2021). Cette signalisation est donc un partenaire essentiel dans la régulation de l'angiogenèse rétinienne. En outre, la voie Wnt a fait l'objet de plusieurs études concernant la régression développementale du réseau vasculaire hyaloïde. En effet, des études récentes suggèrent que cette régression se fait par apoptose laquelle est sous le contrôle de la voie de signalisation Wnt ((Liu *et al.*, 2008; Lobov *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2004). En effet, au cours du développement, les macrophages positionnés autour des vaisseaux hyaloïdes produisent un ligand (Wnt7b) qui active, la voie Wnt en se liant aux récepteurs FZD4/LRP des cellules endothéliales afin de stimuler l'apoptose cellulaire et la régression des hyaloïdes (Lobov *et al.*, 2005). Il est donc évident que la voie Wnt est indispensable dans le processus de formation des vaisseaux rétiens, mais aussi au cours de la régression physiologique des vaisseaux hyaloïdes. Des études ont soulevé le rôle concomitant des voies Notch et Wnt (Corada *et al.*, 2010). D'après ces études, une mutation de la  $\beta$ -caténine dans des cellules endothéliales entraîne une forte augmentation de la signalisation Dll4 / Notch accompagnée d'une activité de germination réduite. Plus intéressant encore, il a été démontré à travers un modèle de cellules souches embryonnaires que la  $\beta$ -caténine est susceptible d'interagir avec le complexe transcriptionnel formé par le domaine intracellulaire de Notch et RBP-J (partenaire transcriptionnel du NICD) afin d'induire l'expression de marqueurs spécifiques d'artères (EphrinB2, NRP1, HES1, Dll4 ou CXCR4) (Yamamizu *et al.*,

2010). La voie Notch et Wnt sont régulées par la Protéine de régulation de la répétition d'ankyrine de Notch (NRARP) qui régule négativement la voie Notch et régule positivement la voie Wnt (Figure 1.9). La relation entre ces deux voies permet la différenciation et la spécialisation des cellules endothéliales (Figure 1.9). La voie de signalisation Notch se présente comme une voie potentielle régulatrice dans le processus de l'angiogenèse.

## **1.2 Les voies de signalisations impliquées dans l'angiogenèse rétinienne**

Plusieurs voies de signalisations concourent dans un ordre hiérarchisé pour la formation et la croissance des vaisseaux sanguins rétiens, afin d'assurer une meilleure vascularisation de la rétine. La signalisation Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) est une des voies les plus étudiées et les plus importantes dans le processus de la formation du réseau vasculaire rétinien (Figure 1.7). L'angiogenèse est contrôlée principalement par l'activation et la signalisation du VEGFR. En effet, des études ont montré qu'en cas d'hypoxie, le VEGF est fortement exprimé et permet le recrutement des vaisseaux dans les régions voisines, afin d'assurer l'approvisionnement en oxygène et en nutriment; puis, l'expression de VEGF diminue lorsque la carence en oxygène est comblée (Suchting, Freitas et Eichmann, 2007) (Suchting, Freitas, & Eichmann, 2007). Toutefois, d'autres études plus récentes ont révélé que l'angiogenèse n'est pas toujours stimulée par une forte expression de VEGF (Suchting. *et al.*, 2007). Cette étude suggère l'existence d'un autre partenaire qui modulerait la signalisation VEGF (Suchting. *et al.*, 2007). La voie VEGF et les voies de signalisation Notch sont étroitement liées. Le VEGF induit l'expression de « Delta-like » (Dll4), qui à son tour limite la réponse de VEGF, et se comportant comme un frein intrinsèque de l'angiogenèse (Figure 1.7). Ce rétrocontrôle négatif, nécessaire au contrôle affiné de la croissance vasculaire, impliquerait l'interaction du récepteur Notch1 et son ligand Dll4 (Figure 1.7) (Assaker, 2015 ; Suchtin. *et al.*, 2007). D'ailleurs, il a été rapporté qu'une inhibition de la signalisation Dll4/Notch engendre une angiogenèse excessive de la rétine (Suchting. *et al.*, 2007).

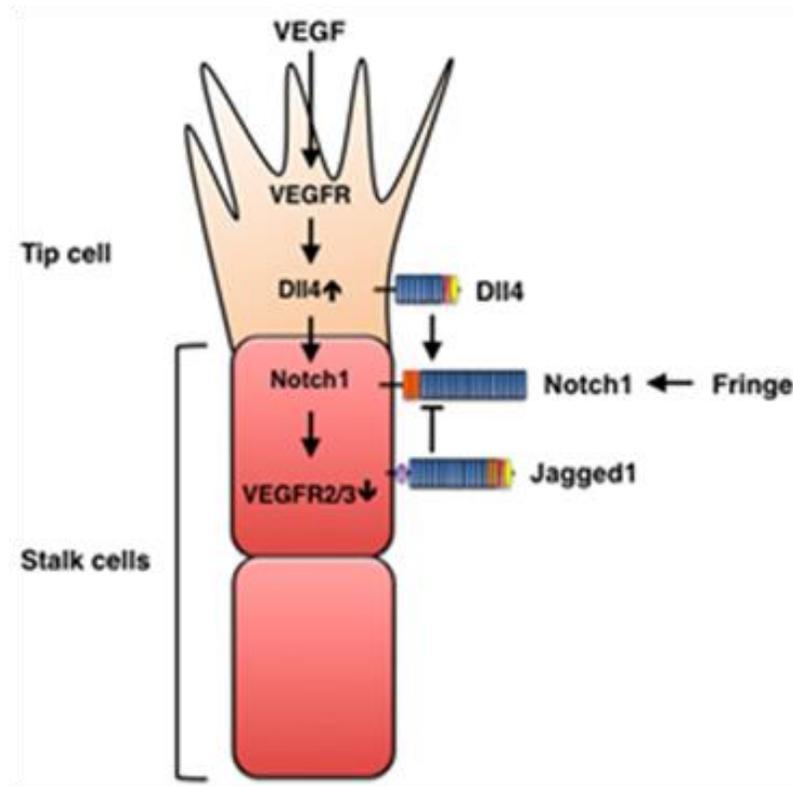


Figure 1.7 : Interaction entre VEGF et la signalisation Notch1-Dll4 au cours de la croissance des vaisseaux sanguins.

La stimulation du VEGFR par le VEGF induit l'expression de Dll-4 par les tip-cells. Dll-4 active Notch-1 dans les « stalk cells » et cette activation inhibe l'expression du VEGFR-2. Les « tip cells » sont très sensibles au gradient de VEGF et étendent des filopodes pour migrer, tandis que les « stalk cells » sont moins sensibles au VEGF et prolifèrent.

### 1.2.1 La voie Wnt

Le gène wingless (Wnt) code pour une famille de glycoprotéines qui interviennent dans de nombreux processus cellulaires tel l'adhésion, prolifération, migration, apoptose, polarité et la différenciation (Angers & Moon, 2009 ; Speese & Budnik, 2007). La voie de Wnt, lorsqu'elle n'est pas active (Figure 1.8a), entraîne le recrutement de la  $\beta$ -caténine cytoplasmique permettant la formation d'un complexe avec l'axine, l'APC (adenomatosis polyposis coli), la caséine kinase 1a (CK1) et le glycogène synthase kinase 3 (GSK3). La  $\beta$ -caténine est phosphorylée par la GSK3 ce qui facilite son ubiquitinylation et la dégradation de dans le cytoplasme par le protéosome (Figure 1.8b). En revanche, la voie Wnt est active lorsque la protéine Norrie ou la famille de protéines Wnt se lie à FZD4 à l'aide de la LRP5 ou la TSPAN12 (Figures 1.8, b, c, d). À la suite à cette liaison,

FZD4, un récepteur à sept domaines transmembranaires se dimérise et s'associe aux deux corécepteurs transmembranaires LRP5 et TSPAN12. Ce complexe active les protéines en aval afin de permettre la dissociation de GSK-3 et APC/Axine de la  $\beta$ -caténine entraînant la phosphorylation de l'extrémité C-terminale cytoplasmique de LRP5 et créant un site de fixation à l'Axine. L'inhibition de l'ubiquitinylation de la  $\beta$ -caténine inhibée par ce complexe permet son accumulation dans le cytoplasme et favorise sa translocation dans le noyau, où elle s'associe aux facteurs de transcription «T-cell factor» (TCF) / «lymphoid enhancer factor» (LEF) afin de stimuler l'expression de plusieurs gènes, dont le VEGF (Figures 1.8e, f).

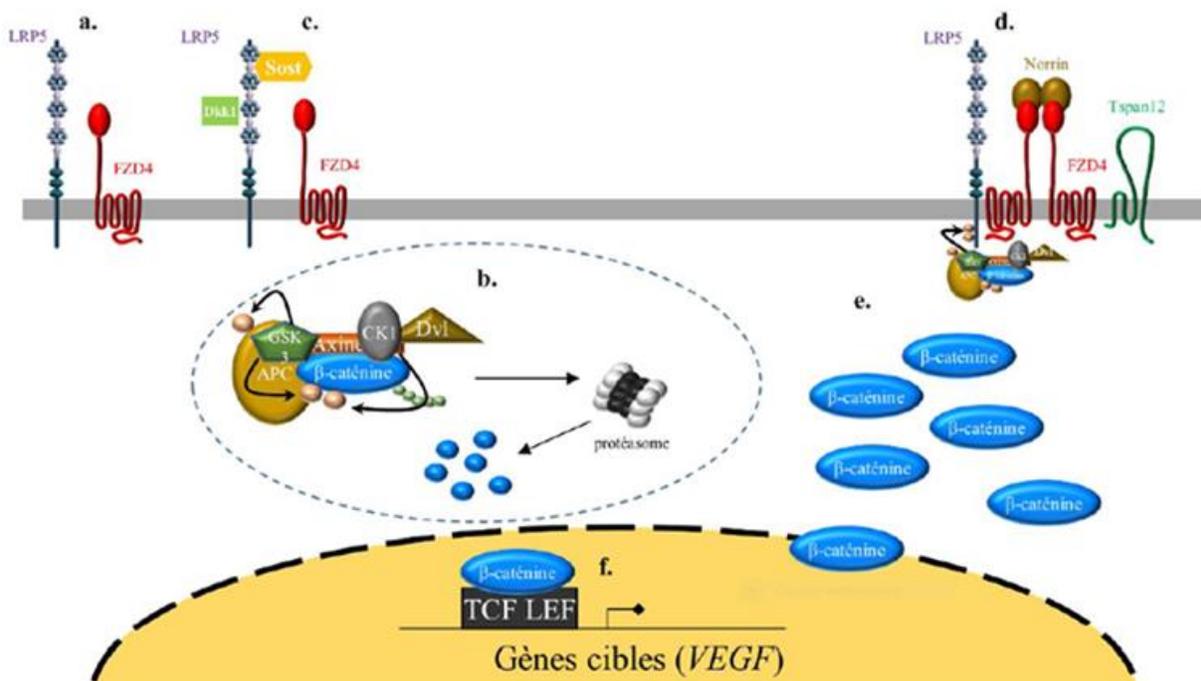


Figure 1.8 : Signalisation canonique de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine.

a. Voie Wnt/ $\beta$ -caténine inactivée (absence de liaison entre LRP5 et FZD4). b. Ubiquitinylation et dégradation de la  $\beta$ -caténine cytoplasmique par le protéasome. c. Inhibition du co-récepteur LRP5. d. Activation membranaire de la voie Wnt. e. Augmentation de la concentration cytoplasmique et translocation nucléaire de la  $\beta$ -caténine. f. Activation ou répression de l'expression de différents gènes (Joiner *et al.*, 2013).

La voie Wnt joue un rôle très important dans l'angiogenèse rétinienne, notamment la différenciation, la migration et la prolifération. Elle participe également au processus d'apoptose décrit lors de la régression développementale des hyaloïdes (Palpant. *et al.*, 2007; Speese & Budnik,

2007). Il a été démontré que les cellules endothéliales expriment des protéines Wnt qui régulent l'angiogenèse physiologique ou pathologique (ischémique) (Leroux et al., 2010). Le rôle de la voie Wnt est surtout déterminant lors de l'angiogenèse postnatale de la rétine. En effet, une récente étude a démontré que la mutation des récepteurs norrie disease protein (NDP), frizzled4 (FZD4) et lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) entraîne un grave défaut de vascularisation de la rétine (Kato et al., 2002; Shen et al., 2021). Cette signalisation est donc un partenaire essentiel dans la régulation de l'angiogenèse rétinienne. En outre, la voie Wnt a fait l'objet de plusieurs études concernant la régression développementale du réseau vasculaire hyaloïde. En effet, des études récentes suggèrent que cette régression se fait par apoptose laquelle est sous le contrôle de la voie de signalisation Wnt ((Liu et al., 2008; Lobov et al., 2005; Xu et al., 2004). En effet, au cours du développement, les macrophages positionnés autour des vaisseaux hyaloïdes produisent un ligand (Wnt7b) qui active, la voie Wnt en se liant aux récepteurs FZD4/LRP des cellules endothéliales afin de stimuler l'apoptose cellulaire et la régression des hyaloïdes (Lobov et al., 2005). Il est donc évident que la voie Wnt est indispensable dans le processus de formation des vaisseaux rétiniens, mais aussi au cours de la régression physiologique des vaisseaux hyaloïdes. Des études ont soulevé le rôle concomitant des voies Notch et Wnt (Corada et al., 2010). D'après ces études, une mutation de la  $\beta$ -caténine dans des cellules endothéliales entraîne une forte augmentation de la signalisation Dll4 / Notch accompagnée d'une activité de germination réduite. Plus intéressant encore, il a été démontré à travers un modèle de cellules souches embryonnaires que la  $\beta$ -caténine est susceptible d'interagir avec le complexe transcriptionnel formé par le domaine intracellulaire de Notch et RBP-J (partenaire transcriptionnel du NICD) afin d'induire l'expression de marqueurs spécifiques d'artères (EphrinB2, NRP1, HES1, Dll4 ou CXCR4) (Yamamizu et al., 2010). La voie Notch et Wnt sont régulées par la Protéine de régulation de la répétition d'ankyrine de Notch (NRARP) qui régule négativement la voie Notch et régule positivement la voie Wnt (Figure 1.9). La relation entre ces deux voies permet la différenciation et la spécialisation des cellules endothéliales (Figure 1.9). La voie de signalisation Notch se présente comme une voie potentielle régulatrice dans le processus de l'angiogenèse.

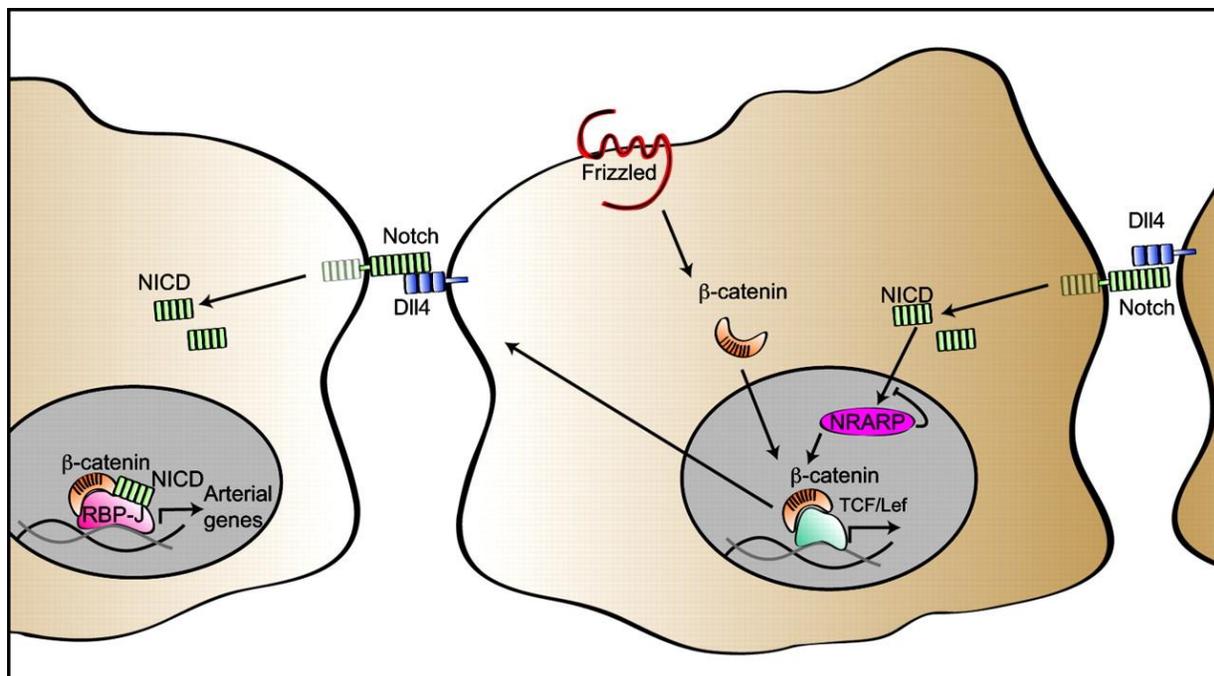


Figure 1.9 : Interaction de la voie Wnt et Notch dans l'angiogenèse rétinienne. (Dejana et al., 2010)

### 1.2.2 La voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch est conservée de *Caenorhabditis elegans* aux mammifères, dont la souris. La voie Notch est impliquée dans plusieurs processus biologiques (différenciation cellulaire, prolifération, apoptose) (Shen et al., 2021). Cette voie de signalisation intervient à tous les niveaux du développement de plusieurs tissus du globe oculaire, dont l'angiogenèse rétinienne (Figure 1.7).

### 1.2.3 Mécanisme général de la voie Notch

En général, cette voie moléculaire est activée à la suite d'une interaction entre les récepteurs d'une cellule émettrice de signal et leurs récepteurs, exprimés sur une cellule adjacente qui reçoit le signal. Dans la voie canonique, l'interaction ligand-récepteur mène à un clivage du récepteur Notch, permettant la libération de son domaine intracellulaire (NICD) et sa translocation au noyau. Il va s'y associer avec son partenaire transcriptionnel RBPJ $\kappa$ , qui est lié au promoteur des gènes cibles de la voie Notch dans l'ADN, permettant ainsi l'expression des gènes cibles de la voie (Figure 1.8). Il existe d'autres mécanismes d'activation de la voie Notch, dits non canoniques qui peuvent être indépendants des ligands de la voie, indépendants de l'association du NICD avec RBPJ $\kappa$  ou encore indépendante du clivage du récepteur.

### 1.2.3.1 Structure des récepteurs et des ligands de Notch

Les protéines de la famille Notch sont des récepteurs transmembranaires. Chez les mammifères, il existe quatre récepteurs NOTCH (1-4) et cinq familles de ligands Notch ; Delta-Like1 (DLL1, 3, 4); Jagged (1, 2, ) (Ng *et al.*, 2021) (Figures 1.10, 1.11).

### 1.2.3.2 Les récepteurs de Notch

Les récepteurs de Notch (1-4) sont des macro-protéines transmembranaires de type I, composées d'un domaine extracellulaire (NEDC) et d'un domaine intracellulaire (NICD) (Ng *et al.*, 2021). Le domaine extracellulaire situé dans la région N-terminale comprend une répétition de motif «Epidermal Growth Factor Like» EGFL (entre 29 et 36). Une partie de ce domaine, notamment les répétitions 11 – 12 et 2-29 de EGFL permettent l'interaction du récepteur et son ligand. La région de régulation négative (NRR) située entre le domaine extracellulaire et le domaine intracellulaire et se compose de trois répétitions riches en cystéine. La région «Lin12/Notch Related» (LNR) et la région d'hétérodimérisation (HD) qui interagissent avec le domaine intracellulaire de Notch (NICD) (Ng *et al.*, 2021). La région NRR joue un rôle crucial puisqu'elle inhibe l'activation du récepteur en absence de ligand (Kopan & Ilagan, 2009).

Le domaine intracellulaire est divisé en deux parties : le domaine RAM (RBP-J Kappa-Associated Module) qui est nécessaire pour faciliter l'association du NICD à son partenaire de transcription CSL (CBF1-Su(H)-Lag1) et le domaine ANK qui est constitué de 7 répétitions Ankyrine. Le domaine NLS (Nuclear Localisation Signal) est encadré par la RAM et le domaine TAD (Transactivation Domain) suivi d'un autre domaine (PEST) fortement impliqué dans la stabilité de NICD et riche en résidus proline (P), glutamine (E), sérine (S) et thréonine (T) (Figure 1.10)

### 1.2.3.3 Les ligands de Notch

Chez les mammifères, il existe 5 ligands de Notch : Delta-Like (Dll 1, 3, 4) et Jagged (Jag 1, 2). Tous les ligands de Notch sont également des protéines transmembranaires composées d'un domaine commun DSL (Delta/Serra/Lag-2) situé dans la partie N-terminale suivi respectivement de 8, 6 et 8 répétitions EGFL. Ce domaine est impliqué dans l'interaction avec une partie (répétitions EGF-Like 11-12) des récepteurs Notch (D'Souza *et al.*, 2010) (Figure 1.11). La famille Jagged et Delta-Like possède en commun un DSL mais diffère par l'insertion de 24 acides

aminés entre les 10e et 11e domaine de type EGF dans Jagged (1,2) et absence dans Dll (1,3,4). Les extrémités C-terminale de DLL1, DLL4 et JAGGED1 sont tous riche en PDZ (Ng *et al.*, 2021).

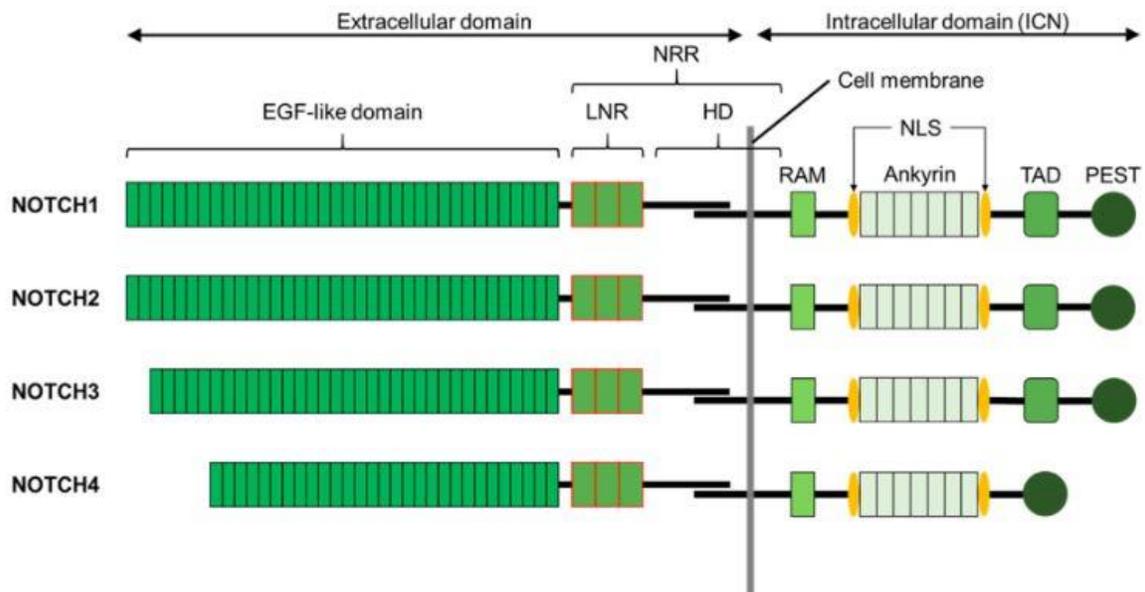


Figure 1.10 : Schéma représentant les récepteurs de Notch. Similarité observée des domaines extracellulaire des quatre récepteurs de Notch avec une différence dans les domaines intracellulaire caractérisé par l'absence de TAD de Notch4 (Ng *et al.*, 2021).

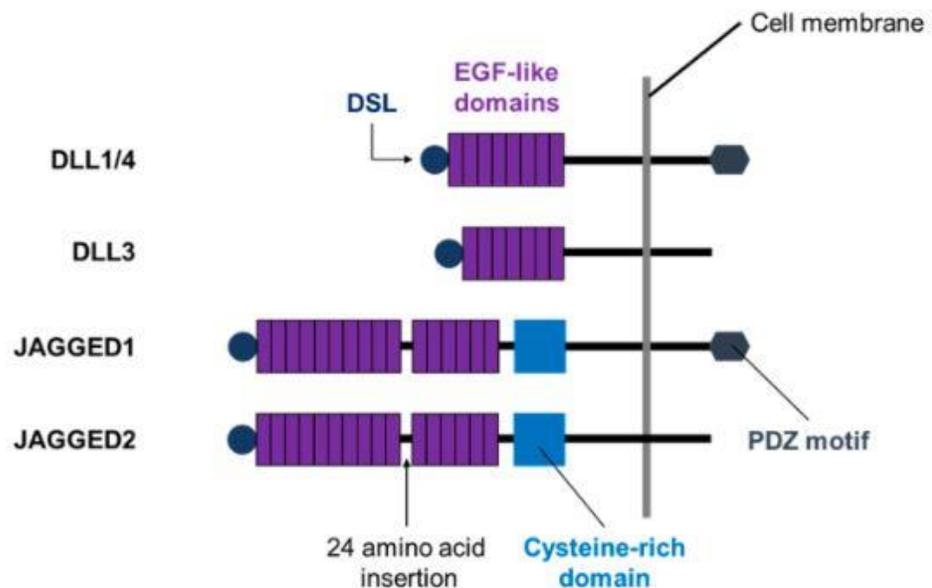


Figure 1.11 : Schéma représentant les ligands de Notch. Les ligands de Notch relevant quelques similitudes (domaines EGF-like repeated DSL) et différences (domaine riche en cystéine).

### 1.2.2 Signalisation Notch

La voie Notch est déclenchée grâce à une interaction entre deux cellules voisines. En effet, à la suite d'un évènement biologique, un récepteur d'une cellule interagit avec le ligand d'une cellule voisine (Figure 1.12). Cette liaison se fait au niveau de région N-terminale du ligand grâce au domaine DSL et aux 2 premières répétitions EGFL (Parks et al., 2006). Une cascade de signalisation aboutit au clivage du NICD au site 2 (S2) au niveau de la région NRR (région régulatrice négative) du récepteur grâce aux protéases transmembranaires ADAM (A disintegrin and metalloprotease) (Figure 1.12). Le clivage médié par ADAM dépend du type de récepteur et de la situation d'activation de Notch. Ainsi le type de protéase est choisi en fonction du contexte cellulaire nécessitant l'activation de la signalisation Notch et de deux protéases différentes peuvent stimuler le clivage de deux récepteurs ayant pourtant des structures similaires. C'est le cas de Notch1 et de Notch2 qui sont respectivement clivés par ADAM17 et ADAM10 (Habets et al., 2015). Ce type de clivage permet de libérer le domaine extracellulaire de Notch (NEXT) (Kopan & Ilagan, 2009). Un deuxième clivage est nécessaire pour permettre la libération du NICD (Figure 1.12). Celui-ci se déplace ensuite vers le noyau où il forme un complexe transcriptionnel contenant la protéine de liaison à l'ADN CBF1/RBPjk/Su(H)/Lag1 (CSL) conduisant à l'expression des gènes cibles ( la famille de gène HES, Myc, p21) de Notch (Kopan, 2012) (Figure 1.12). Le NEXT est clivé au site S3 par le complexe gamma-secretase. Plusieurs études ont montré que le DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester) est utilisé pour empêcher la libération de NICD en interférant avec la gamma sécrétase entraînant donc l'inhibition du clivage de Notch au site S3 (Kopan, 2012). À cet effet, elle est particulièrement impliquée dans le processus de l'angiogenèse physiologique, mais aussi pathologique de la rétine.

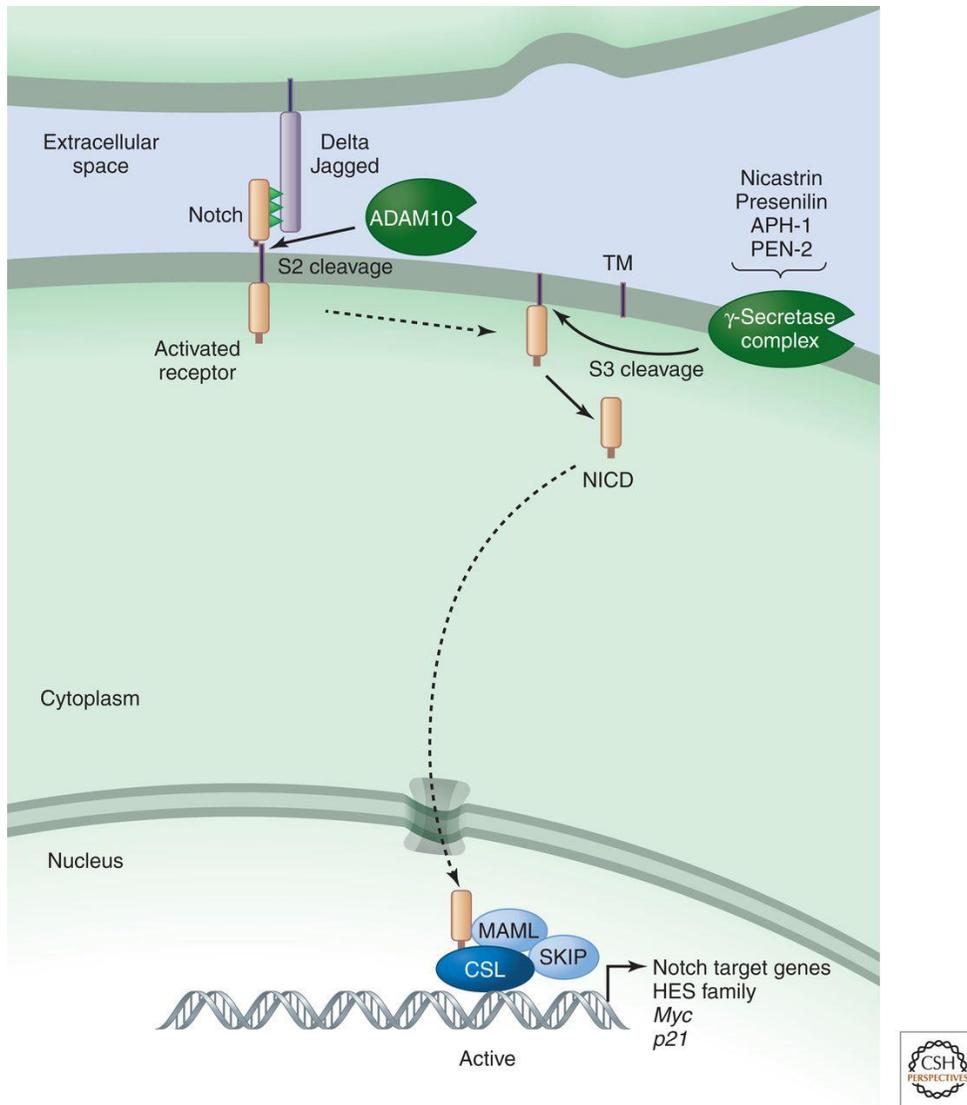


Figure 1.12 : La voie de signalisation NOTCH.

Le récepteur Notch subit un premier clivage par la furine (S1). Après l'interaction avec son ligand, ici Jagged, Notch subit un second clivage (S2) par la protéase TACE et un troisième clivage (S3) par le complexe  $\gamma$ -sécrétase. Ceci permet la libération de NICD, qui migre dans le noyau grâce à la présence de signaux NLS où il forme un complexe activateur de la transcription avec CSL, qui active les gènes cible de la famille HES/HEY (hairy enhancer of split). La liaison de l'ICN aux CBF1-Su-Lag1 (CSL) dans le noyau s'effectue au niveau de la séquence RAM et lève l'effet répresseur des CSL. Cela permet l'activation de la transcription des gènes cibles comme les facteurs de transcription de la famille HES (Kopan & Ilagan, 2009).

### 1.2.2.1.1 Implication de la voie de Notch dans le développement embryonnaire

La voie Notch joue un rôle prédominant au cours du développement, notamment au niveau de la différenciation, du maintien des cellules souches et de la spécification du destin cellulaire (Radtke

et Raj, 2003). Pendant l'organogenèse du pancréas, l'activation de la voie NOTCH est cruciale pour assurer la prolifération des cellules progénitrices et prévenir la différenciation prématurée (Edlund, 2002). En outre, l'activation de la signalisation Notch a été impliquée dans l'inhibition de la transcription de la Neurogénine (NGN3) en plus de déstabiliser la protéine NGN3, un facteur de transcription impliqué dans la détermination des cellules endocriniennes (Jang *et al.*, 2006 ; Qu *et al.*, 2013). L'activation de la voie NOTCH prévient la différenciation des cellules progénitrices en cellules endocrines dans les stades précoces du développement du pancréas. Ainsi, au cours du développement, Notch contrôle la détermination cellulaire par inhibition latérale ou par signal inductif (Radtke et Raj, 2003). La signalisation Notch joue un rôle crucial dans le processus de formation des cellules sanguines (hématopoïèse) ; notamment dans le mécanisme de maturation des lymphocytes (T et B). Il a été démontré que chez la souris, l'activation de la voie Notch1 dans les cellules précurseurs de lymphocytes au niveau du thymus entraîne leur différenciation en lymphocytes T. Cependant en cas d'inactivation de la signalisation Notch, les cellules précurseurs de lymphocytes adopteront un destin de lymphocytes B par défaut (Borggreffe et Oswald, 2009). Il a été suggéré dans une récente étude que la voie Notch est susceptible d'induire une signalisation pouvant aboutir à une différenciation cellulaire terminale. Cette étude stipule que l'activation de la voie Notch permet l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et favorise la différenciation des kératinocytes (Lowell *et al.*, 2000).

Nous avons montré le rôle de la voie Notch dans le processus de différenciation et de spécialisation des cellules artérielles et veineuses au cours de l'angiogenèse.

Ainsi, la voie Notch joue un rôle central dans le développement de plusieurs organes. Cependant, lorsque cette signalisation est activée de manière aberrante, elle engendre plusieurs pathologies, dont le cancer.

#### **1.2.2.1.2 Notch dans le développement pathologique**

La voie de signalisation Notch est très impliquée dans plusieurs aspects biologiques où elle joue un rôle bénéfique pour plusieurs organismes. Cependant, cette voie de signalisation est avérée être incriminée dans plusieurs cas de pathologies qu'il convient de faire mention. Plusieurs études ont relié l'activation de la voie de signalisation Notch dans plusieurs cancers (Bruno *et al.*, 2018). Ainsi, une étude réalisée sur un modèle de carcinogenèse pancréatique montrant des lésions néoplasiques

intraépithéliales (PanINI-3) révèle une augmentation de l'expression des protéines, mais aussi de l'ARNm des différents récepteurs de la voie Notch (Mullendore *et al.*, 2009; Plentz *et al.*, 2009). Cette étude montre que l'inhibition de la voie de signalisation de la voie Notch dans les cellules cancéreuses pancréatiques entraîne non seulement une diminution de leur prolifération, mais aussi limite la progression tumorale dans un modèle murin (Pdx1-Cre LSL-KrasG12D p53Lox/+) de cancer pancréatique. Il a été également souligné que des mutations liées au récepteur Notch1 entraînent une Leucémie Aigues Lymphoblastique de type T (LAL-T ou T-ALL) (Ellisen *et al.*, 1991; Kastner et Chan, 2006). Plus récemment, des études ont relevé qu'une déficience de la signalisation Notch engendre le développement anarchique du système vasculaire rétinien. En effet, Eichmann a démontré un défaut du réseau vasculaire rétinien qui engendre un arrêt de l'angiogenèse des vaisseaux rétiniens dans un modèle de souris où l'expression du ligand Dll4 a été inhibée (Eichmann *et al.*, 2008).

Ces exemples de pathologies résultantes d'une activation aberrante de la voie Notch soutiennent l'importance de la signalisation Notch. Un des enjeux de la recherche scientifique est de travailler à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation des voies dépendantes de Notch nécessaire pour maintenir l'homéostasie cellulaire et tissulaire.

#### **1.2.2.2 Modulation de l'interaction récepteur-ligand**

La voie de signalisation Notch est déclenchée en réponse à un besoin cellulaire précis. Ainsi, l'interaction des récepteurs Notch avec JAG1 provoquerait une réponse plus faible que celle engendrée à la suite de l'interaction avec Dll1. Cette faible réponse s'expliquerait par la transcription d'un sous-groupe de gènes cibles qui répondent à de faibles niveaux d'activation de Notch tel que HEY1. Cependant, certains gènes cibles comme HES5 requièrent un fort signal Notch pour leur expression (Bray, 2016). Ainsi, la force d'interaction ligand-récepteur influencerait non seulement l'efficacité de clivage du récepteur, mais aussi participerait à la détermination de l'amplitude du signal Notch conduisant à un patron transcriptomique distinct responsable d'une réponse cellulaire précise (Bray, 2016). Il a été suggéré que l'interaction des récepteurs et des ligands qui modulent l'activation de la voie Notch est sous le contrôle de la famille de gène frange (Lunatic Fringe, Manic Fringe et Radical Fringe) responsable de la glycosylation des récepteurs. Une étude intéressante a montré que Lunatic fringe module différemment la signalisation selon le récepteur Notch (LeBon *et al.*, 2014). Cette étude suggère que Lunatic fringe, inhibe la

signalisation Notch1 induite par Jag1 et non par Dll1. La même étude montre que Lunatic fringe potentialise la signalisation Notch2 à la fois médiée par Jag1 et Dll1.

Pendant longtemps certains scientifiques estimaient qu'une même cellule ne peut exprimer à la fois les récepteurs et les ligands de Notch. Une récente étude a démontré que cela est possible, mais que les récepteurs et les ligands s'expriment à des ratios différents (Morrison *et al.*, 2000). Toute la complexité de la signalisation Notch est révélée dans cette étude qui estime que l'activité de Notch est déduite par les niveaux d'expression de ses récepteurs et de ses ligands.

En somme, les données de la littérature suggèrent que la régulation et le type d'interaction récepteur-ligand modulé par FRINGE influencent la force du signal Notch et dictent ainsi la réponse cellulaire guidée via Notch.

### **1.2.2.3 Translocation du NICD et activation des effecteurs**

Les gènes cibles de Notch sont des facteurs de transcription appartenant à la famille de HES/HEY. Il existe chez les mammifères, 7 facteurs de transcription de la famille HES (HES1-7) et 3 de la famille HERP (HEY1 HEY2 et HEYL) (Assaker, 2015 ; Ng *et al.*, 2021). La répression transcriptionnelle se fait suivant un mécanisme actif ou passif. La répression active se fait grâce à la liaison de HES et/ou HEY au promoteur des gènes cibles permettant le recrutement des corécepteurs tels que GROUCHO/TLE (Lee *et al.*, 2001; Qu *et al.*, 2013). Ainsi, dans le processus de différenciation des cellules souches pancréatiques en cellules endocrines, HES1 a montré un pouvoir inhibiteur de ce processus en inhibant la Neurogenine 3 (J. C. Lee *et al.*, 2001 ; Qu *et al.*, 2013). La transcription de certains inhibiteurs du processus du cycle cellulaire tel que p21, p27 et p57 est réprimée par HES1 (Fischer et Gessler, 2007). Dans la répression passive, la liaison du promoteur est inhibée par un dimère formé grâce à la liaison d'une protéine de la famille HES ou HEY avec un activateur de transcription. Ces facteurs (HES ou HEY) étant directement ciblés dans la signalisation Notch, ils répriment des marqueurs idéals dans le suivi de cellules exprimant Notch (Iso *et al.*, 2003).

La voie de signalisation régule plusieurs processus biologiques dont la prolifération cellulaire, le destin cellulaire, la différenciation et la mort cellulaire chez tous les mammifères. Des études récentes ont rapporté l'activation de la voie de signalisation Notch est impliquée dans le phénomène

de sénescence (Hoare *et al.*, 2016 ; Teo *et al.*, 2019). Il est stipulé que la voie Notch est un médiateur essentiel de la sénescence induite par un oncogène.

### **1.3 La sénescence cellulaire**

Décrite pour la première fois par Leonardo Hayflick dans les années 1960 (Hayflick et Moorhead, 1961), la sénescence vient du mot latin : ‘senex’ qui veut dire vieil homme ou grand âge. Pendant longtemps, la sénescence a été définie comme étant un vieillissement biologique qui correspond à la détérioration progressive des paramètres fonctionnels des organismes vivants (Brondello *et al.*, 2012; Hayflick, 1965). Elle a souvent été associée au cancer, car pour échapper à la mort, les cellules sénescents acquièrent certaines caractéristiques des cellules cancéreuses (Brondello *et al.*, 2012; Hayflick, 1965). La sénescence cellulaire se définit désormais comme étant l’arrêt irréversible du cycle cellulaire associé à des changements physiologiques ou pathologiques (Boyer *et al.*, 2014). On distingue deux types de sénescence, celle induite par un stress, et la sénescence répllicative.

#### **1.3.1 Mécanisme de la sénescence cellulaire**

La sénescence cellulaire peut être induite par des facteurs exogènes (radiations UV, drogues, chimiothérapeutiques) ou par des facteurs endogènes (activation des oncogènes Ras, Raf, stress oxydatif). Selon le type de stimulus à l’origine de la sénescence, celle-ci peut être répllicative, c’est-à-dire, arrêt de division après plusieurs divisions, ou accélérée, par arrêt de la division à la suite de dommages à l’ADN.

Hayflick a remarqué qu’après un certain nombre de divisions mitotique, des cellules en culture arrêtaient de se diviser (L. Hayflick & Moorhead, 1961) et cet arrêt était marqué par un raccourcissement du télomère. Le télomère est une région formée de plusieurs séquences répétées de nucléotides (TTAGGG) associées à des protéines spécialisées situées à l’extrémité linéaire de chaque chromosome (Fagagna *et al.*, 2003). Il a pour fonction de préserver l’intégrité du chromosome en protégeant contre la dégradation et en empêchant la fusion entre les chromosomes (Fagagna *et al.*, 2003 ; de Lange, 2002). Toutefois, au cours d’une division mitotique entraînant la réplication de l’ADN, la longueur du télomère diminue et lorsque celui-ci atteint une taille critique (limite de Hayflick), la division cellulaire s’arrête de façon irréversible (Harley *et al.*, 1990). La cellule entre alors dans un état de sénescence, elle arrête de se diviser en phase G1 (Fagagna *et al.*,

2003). Le devenir de cette cellules reste encore mal compris. Des études ont montré que ce processus est bouleversé dans le cas de cellules cancéreuses où la longueur des télomères est maintenue grâce à l'enzyme télomérase qui ajoute des répétitions de nucléotides au niveau de la séquence télomérique (Figure 1.13) (Kim et al., 1994).

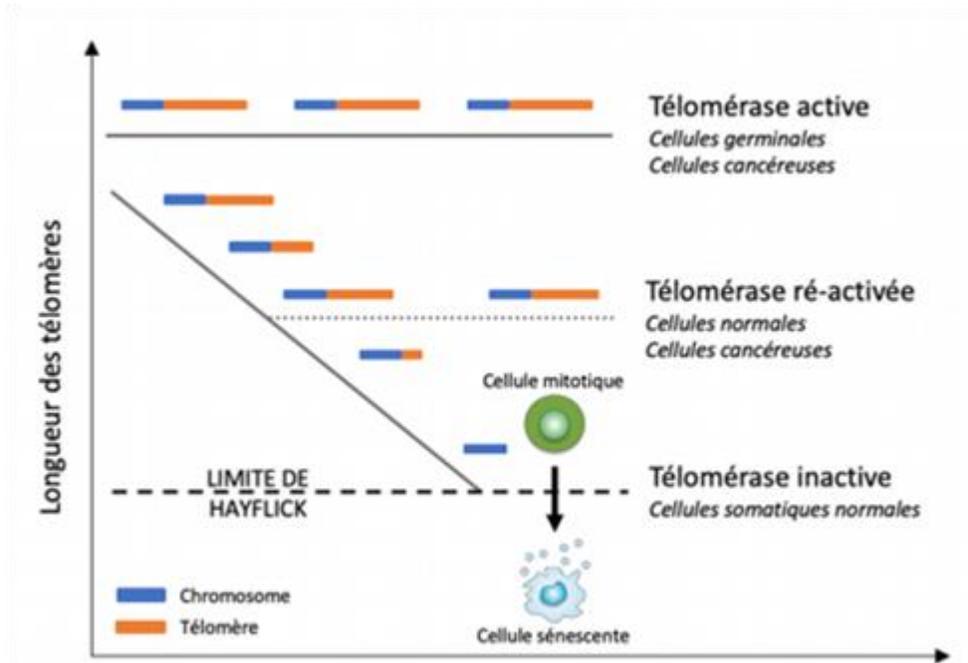


Figure 1.13 : Télomères et sénescence répliquative. Illustration de la télomérisation à la suite d'une division cellulaire répétée (Campisi et al., 2007).

Des études ont également rapporté que la sénescence peut être déclenchée à la suite d'un dommage irréparable de l'ADN (D'Adda di Fagagna et al., 2003). Cet état cellulaire, appelé sénescence prématurée ou sénescence induite par le stress, diffère de la sénescence répliquative décrite par Hayflick (Bischof et al., 2009). En effet, à la suite d'un stress oxydatif induit par un dysfonctionnement mitochondrial ou une expression d'oncogènes tels que Myc, Ras ou Raf, l'ADN subit un dommage, puis le mécanisme de sénescence se met en place (Figure 1.14). La cassure de l'ADN est détectée grâce à un réseau de signalisation complexe qui reconnaît la nature du dommage (cassure simple brin ou double brin). S'en suit le recrutement des protéines kinases ATM (ataxia-telangectasia mutated) et ATR (ataxia-telangectasia and Rad3-related) qui phosphorylent le variant d'histone H2AX dans la région proximale de la lésion de l'ADN. Cette phosphorylation entraîne le blocage de l'activation de la caséine kinase 1a (CDK1 et CDK2) qui inhibent les phosphatases de la famille Cdc25 (Figure 1.14). Puisque CDK1 et CDK2 sont bloquées,

elles ne peuvent plus contrôler la réplication mitotique (Stein & Dulić, 1995) et cela entraîne l'arrêt transitoire du cycle cellulaire (Stein & Dulić, 1995). Dans le même temps, ATM stimule l'induction de p21 par l'intermédiaire de p53 qui régule l'expression de p21 (Polager & Ginsberg, 2009). Par phosphorylation, p21 empêche l'activation de retinoblastoma protein (pRb) et séquestre les facteurs de transcriptions E2F entraînant le blocage de CDK1 et CDK2, ce qui assure l'irréversibilité de l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G1 et G2 (Polager & Ginsberg, 2009). Une autre signalisation induisant la sénescence est la voie impliquant l'inhibiteur des kinases p16Ink4A. En effet, des études récentes ont montré que p16Ink4A est un acteur majeur de la sénescence au même titre que le SA- $\beta$ -galactosidase reconnu comme marqueur spécifique de la sénescence (Krishnamurthy et al., 2004). Il a été démontré que p16Ink4A joue un rôle prépondérant comme barrière anti-tumeur. Cependant, son implication dans le processus de sénescence reste mitigée (Gil & Peters, 2006; Herbig et al., 2004).

### **1.3.2 Rôles de la sénescence**

Pendant longtemps, les chercheurs ont focalisé l'essentiel de leur recherche sur la compréhension du mécanisme de la sénescence dans des cas pathologiques. Des recherches récentes menées par l'équipe de Manuel Serrano et de William Keyes en 2013 montrant l'existence de cellules sénescents lors du développement embryonnaire ont toutefois bouleversé les dogmes de cette science (Storer et al., 2013; Daniel et al., 2013). La sénescence a souvent joué un rôle d'ange en se constituant comme barrière antitumorale freinant ainsi l'avancement de certains cancers. Son rôle bénéfique est également noté dans le cas d'une lésion tissulaire où elle facilite la réparation des

plaies. Dans certains cas de cancer, la sénescence joue un rôle de démon en favorisant la propagation des cellules cancéreuses.

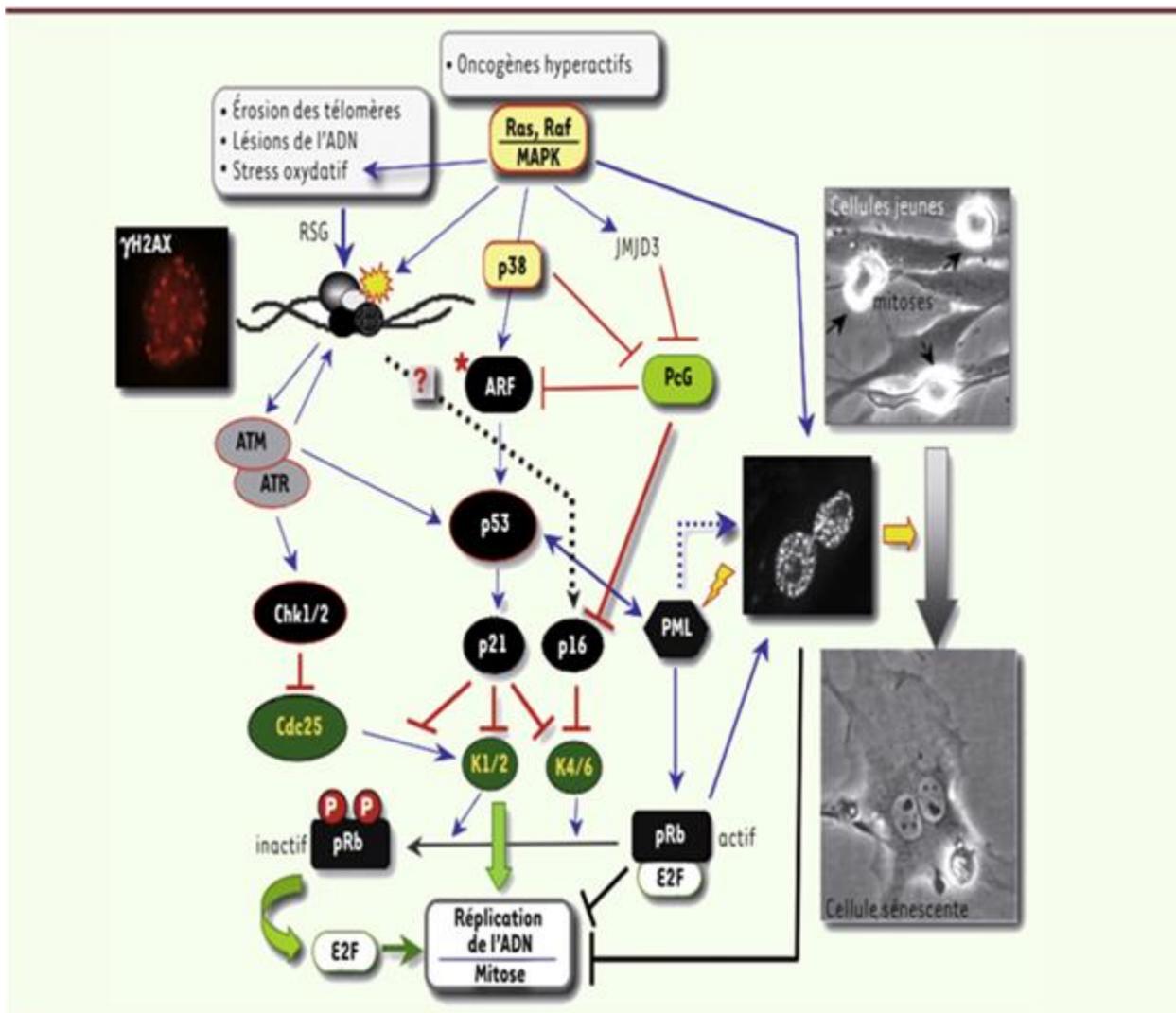


Figure 1.14 : Mécanisme moléculaire de la sénescence causée par de dommages à l'ADN. Une cassure de l'ADN est détectée par le complexe MRE11-RAD50-NBS1 et le complexe RAD9-RAD1-HUS1 recrute les kinases (ATM et ATR). Le kinase ATM, activées par 53BP1 s'associe à l'ATR pour phosphoryler le variant d'histone H2AX. Par la suite, les kinases CHK1 et CHK2 sont mobilisées et phosphorylent le facteur de transcription p53 et la phosphatase CDC25. À l'issue de ce mécanisme, si le dommage est réparé, la cellule prolifère. Sinon, elle devient sénescente (Brondello *et al.*, 2012).

### 1.3.2.1 Rôle bénéfique de la sénescence

Plusieurs études réalisées *in vitro* et confirmées par des études *in vivo* ont révélé que la sénescence joue un rôle de suppresseur d'oncogène et serait donc une barrière efficace contre le développement

des tumeurs (Collado & Serrano, 2010). (Muñoz-Espín & Serrano, 2014). Dans une étude, Collado M et son équipe ont montré une présence accrue de cellules sénescents autour des cellules bénignes ou précancéreuses de la peau (mélanocytes). Cependant, lorsqu'ils ont bloqué la voie de signalisation p53 (tumor protein 53) et pRB (retinoblastoma protein) dans des cellules pancréatiques malignes, une absence de cellules sénescents a été notée (Collado & Serrano, 2010; Michaloglou et al., 2005). Ces résultats indiquent que la présence des cellules sénescents permet le blocage de la prolifération et favorise la suppression des cellules malignes témoignant le rôle anti-tumoral de la sénescence. La présence des cellules malignes serait aussi expliquée par l'inhibition de la sénescence grâce à l'inactivation des voies p53 et pRB.

Le mécanisme de la sénescence a été détecté dans certains organes durant le développement embryonnaire chez des mammifères, notamment le sac endolymphatique, l'oreille interne et le mésonéphros (Muñoz-Espín et al., 2013). Dans cette étude, il a été rapporté que cette sénescence est activée et entretenue par la signalisation p21 au détriment de celle de la signalisation p53 et d'autres inhibiteurs du cycle cellulaire (Muñoz-Espín et al., 2013). Dans le cas échéant, les cellules sénescents s'accumuleraient de façon continue engendrant une pathologie (Figure 1.15) (Yun et al., 2015).

La sénescence joue également un rôle bénéfique dans le processus de cicatrisation et de régénération. Une équipe de scientifiques en 2014 a démontré que l'apparition momentanée de cellules fibroblastes sénescents chez des souris auxquelles des plaies avaient été induites, permettait le recrutement des cellules endothéliales au niveau de cette plaie par la sécrétion de cytokines ainsi que la sécrétion de facteurs de croissance, dont le PDGF-AA, qui permettait la fermeture des plaies (Demaria et al., 2014). Dans cette même étude, ils ont révélé que l'élimination des fibroblastes sénescents retardait, au contraire, le processus de cicatrisation. L'implication de la sénescence dans le processus de régénération a également été montrée dans une récente étude ; dans laquelle les auteurs expliquent que lorsqu'un tissu subit un dommage, les cellules deviennent sénescents et sécrètent les SASP (cytokines et chimiokines) qui permettent de recruter les cellules immunitaires, dont les macrophages qui éliminent les cellules défectueuses et permettent la régénération du tissu (Figure 1.15) (Campisi et d'Adda di Fagagna, 2007).

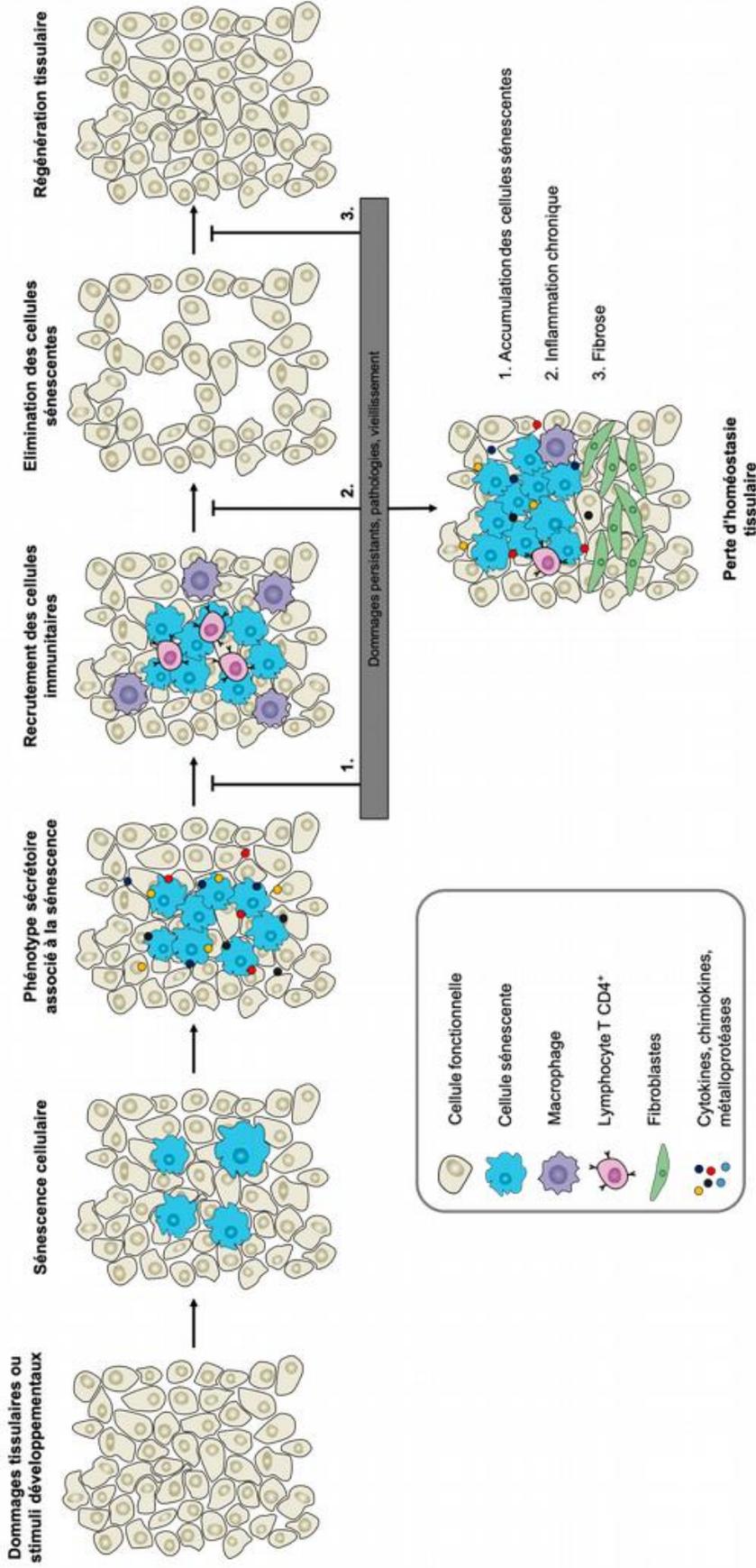


Figure 1.15 : Réhabilitation d'un tissu par le processus de sénescence. Les cellules d'un tissu endommagé ou abimé rentrent en sénescence et sécrètent un SASP qui permet le recrutement des cellules immunitaires. La sénescence amorce un processus de remodelage tissulaire en recrutant macrophages qui phagocytent les cellules abimées. Le tissu se régénère. Une pathologie grave peut se déclencher dans des cas des dommages importants (Campisi et d'Adda di Fagnana, 2007).

### 1.3.2.2 Rôle de la sénescence dans différentes pathologies

Contrairement à sa contribution à la suppression tumorale et à la cicatrisation, la sénescence est impliquée dans le vieillissement dans certaines pathologies associées à l'âge (Rodier et Campisi, 2011; Serrano et Blasco, 2007). Dans un modèle murin, il a été démontré que l'induction du marqueur de sénescence p16 conduit au vieillissement favorisé par l'altération de l'homéostasie (Collado *et al.*, 2007; Collado et Serrano, 2010). Certaines études ont rapporté un nombre élevé de cellules sénescence dans plusieurs tissus et organes au cours du vieillissement (Baker et al., 2011). Il a également été prouvé que des maladies de vieillesse telles que l'arthrose et l'athérosclérose seraient causées par la sénescence (Rodier et Campisi, 2011).

Il est connu que l'athérosclérose est causée par une obstruction progressive des artères impliquant les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses ainsi que les cellules immunitaires (Muñoz-Espín *et al.*, 2013). Une étude rapporte la présence de cellules endothéliales sénescences au cours de cette pathologie qui sécrètent massivement les cytokines IL-1, IL-6 ou TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) (Rodier et Campisi, 2011). Ces facteurs stimulent les macrophages, favorisent l'amplification de la signalisation pro-inflammatoire et entraînent l'augmentation des radicaux libres et des dommages à l'ADN. Comme résultats, le vieillissement prématuré des cellules lisses musculaires engendre la perte de leur fonction et cause ainsi la formation continue d'athérome (substance grasseuse) (Muñoz-Espín, *et al.*, 2013; Rodier et Campisi, 2011).

Dans des cas d'arthrose qui est une maladie affectant principalement les grandes articulations (genoux, mains et hanches), c'est la dégénérescence du cartilage de conjugaison et l'augmentation de l'ossification de l'articulation qui sont mises en cause (Brondello *et al.*, 2010). La matrice extracellulaire composée de chondrocytes permet de maintenir la structure du cartilage (Brondello et al., 2010; Tachikart et al., 2019; Boulestreau et al., 2021). Cette matrice est régulièrement renouvelée grâce à des sécrétions enzymatiques. La diminution de la fonction de cette matrice est associée à la sénescence prématurée et à la sécrétion des molécules pro-inflammatoires et des métalloprotéases (Brondello *et al.*, 2010). Cette sénescence s'explique par l'accumulation des radicaux libres et le stress mécanique créé par les mouvements répétés (Brondello *et al.*, 2010).

Une étude récente menée par Ouabaha et son équipe a révélé que les SASP sécrétés par les cellules sénescents favorisent l'angiogenèse pathologique par propagation paracrine tout en portant une entrave à la régénération vasculaire (Oubaha et al., 2016). L'étude rapporte également que l'inhibition des SASP permettait l'élimination des néovaisseaux pathologiques responsables de l'ischémie rétinienne chez des souris (Oubaha et al., 2016). L'ensemble de ses illustrations témoignent la double identité du phénomène de la sénescence pouvant se comporter tantôt comme une solution à certaines maladies, tantôt elle est à l'origine d'autres pathologies.

## **1.4 Les maladies des yeux**

### **1.4.1 Les vitrorétinopathies**

Les vitrorétinopathies sont des rares anomalies oculaires génétiques qui affectent particulièrement l'humeur vitrée et/ou la rétine. Elles sont caractérisées par un développement vasculaire anormal ou incomplet de la rétine périphérique au cours du développement embryonnaire et sont susceptibles d'entraîner la cécité le décollement de la rétine (Berger et al., 2010). Ces rétinopathies résultent d'un dysfonctionnement développemental du réseau vasculaire hyaloïde. Il convient de rappeler que les vaisseaux sanguins transitoires (hyaloïdes) qui assurent l'apport d'oxygène et de nutriments nécessaires au bon développement de la rétine immature régressent de façon physiologique à la naissance, pour être remplacés par les vaisseaux vasculaires rétinien matures (Nayak et al., 2018). Cependant, une entrave à ce processus entraîne une persistance anormale et progressive des vaisseaux hyaloïdes au cours de l'enfance. Cette persistance constitue une source de maladies caractérisées par un développement rétinien aberrant avec cécité congénitale (Saint-Geniez et al., 2004).

Parmi les rétinopathies, se trouvent les vitreo-rétinopathies exsudatives familiales (FEVR), vitrées primaire hyperplastique persistant (PHPV), la maladie de Norrie (ND), et la maladie de Coats. Des études ont montré que ces maladies sont génétiquement hétérogènes et liées à des mutations de quatre gènes principalement, FZD4, LRP5, TSPAN12 et NDP codant pour des protéines de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Chen et al., 1993 ; Kassumeh et al., 2021 ; Poulter et al., 2010 ; Toomes et al., 2004). En effet, la genèse de toutes ces maladies est intimement liée au gène NDP (Norrie disease

Protein) exprimé par les cellules de Muller, qui est essentiel dans la signalisation Wnt (Nikopoulos et al., 2010 ; Poulter et al., 2010 ; Toomes et al., 2004) (Figure 1.8).

#### **1.4.1.1 Les vitréo-rétinopathies exsudatives familiales (FEVR)**

Les vitréorétinopathies exsudatives familiales sont des pathologies héréditaires rares affectant le vitré. Elles résultent d'un arrêt brutal et temporaire du développement de la vascularisation de la rétine périphérique (Errais et al., 2008). Il a été démontré que ces maladies sont généralement transmises selon le mode autosomal, mais également récessif. Seuls les garçons manifestent la maladie, car elle est portée par le chromosome sexuel X. Il est connu que la forme autosomale de la maladie est associée à des mutations des gènes FZD (11p14-q21), LRP (11q13.4) et ZNF408(11p11.2) tandis que la forme gonosome est associée à des mutations du gène codant protéine Norrie Disease Protein NDP (Xp11.4-p11.3). Cependant, quelques rares cas de la maladie sont associés à des mutations de TSPAN12 (7q31.31) (Chen *et al.*, 1993 ; Kassumeh *et al.*, 2021; Poulter *et al.*, 2010 ; Toomes *et al.*, 2004). Les vitréorétinopathies exsudatives familiales( FEVR) présentent des caractéristiques similaires à celles observées dans le cas des rétinopathies du prématuré, mais sans prématurité ou de petit de poids associés. Cependant, dans certains cas graves, des hémorragies intravitréennes, des exsudations lipidiques intrarétiniennes, l'œdème, l'ectopie maculaire (déplacement de la surface rétinienne sous l'effet de phénomènes contractiles) et de la rétraction du vitré (Figure 1.16b) ont été recensés (Natung *et al.*, 2013).

#### **1.4.1.2 Maladie de Norrie**

Le gène NDP est responsable de la maladie de Norrie. Ce gène NDP code pour la protéine Norine qui est un facteur de croissance intervenant dans le développement vasculaire de certains organes tels l'œil (Chen et al., 1993; Goodwin et al., 2002). Plusieurs études ont identifié des mutations liées au gène NDP (XP11.4-P11.3) (Chen et al., 1993; Kassumeh et al., 2021; Toomes et al., 2004). La maladie affecte presque uniquement les garçons, car elle suit un mode de transmission liée au chromosome X. Les femmes sont, dans la plupart du temps, des porteuses saines (Klein, 1972). Un garçon atteint de la maladie de Norrie présente très souvent les anomalies oculaires bilatérales et symétriques, une importante masse de couleur grisâtre ou jaunâtre est souvent observée. Dans certains cas, un décollement partiel ou complet de la rétine survient après deux mois de vie (Figure 1.16a). Des cas de surdité, des troubles intellectuels et un retard de croissance associés ont été

également soulignés (Klein, 1972; Meola, 2011) ((Balmer et al., 2005; Natung et al., 2013; Poulter et al., 2010).

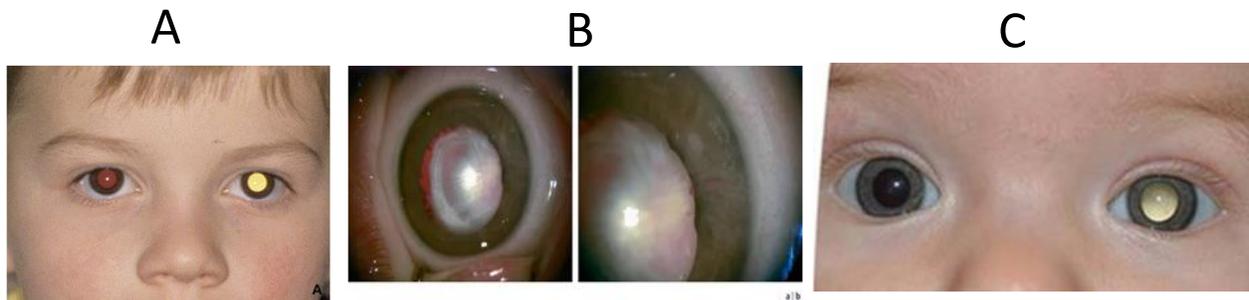


Figure 1.16 : Manifestations cliniques.

(a). Maladie de Norrie montrant. Image montrant une masse blanc-jaunâtre de la rétine immature. (B) œil montrant Persistance de la tunique vasculaire postérieure du cristallin, étirement des procès ciliaires en temporal et vaisseau irido-hyaloïdien vu flou en nasal. Le cristallin de cet œil est clair. Le vaisseau irido-hyaloïdien est bien vu en nasal. (C). Maladie de Coast montrant des exsudats massifs au pôle postérieur donnent une coloration jaunâtre à la leucocorie (Tanzariello, 2004) (Ho, 2012).

#### 1.4.1.3 Maladie de Coast

D'autres études ont montré que la mutation du gène NDP est également responsable de la maladie de Coast (Boucher *et al.*, 2016), une maladie se caractérise par un développement anormal des vaisseaux sanguins rétiniens causant une désorganisation de la paroi des vaisseaux. Ceux-ci deviennent anormalement perméables, entraînant une importante production d'exsudats qui s'accumulent par la suite dans la région maculaire, causant un rétinoblastome endophyte. Dans le cas grave, l'accumulation d'exsudats entraîne le décollement de la rétine. Outre la baisse ou la perte de vision, la maladie se caractérise aussi par la formation d'une leucocorie (reflet blanchâtre de la pupille) causée par des exsudats jaunâtres accumulés au pôle postérieur (Figure 1.16c) (Balmer et al., 2007).

#### 1.4.1.4 Vitrée primaire hyperplastique persistant (PHPV)

Le vitré primaire hyperplastique persistant est une pathologie congénitale résultante d'un défaut de régression des structures embryonnaires : le vitré primitif et le réseau vasculaire hyaloïde. Le tissu mésenchymateux, initialement destiné au développement vasculaire, forme une masse derrière le cristallin entraînant l'apparition d'une membrane rétrolentale blanchâtre susceptible de produire

une leucocorie (Figure 1.16b). L'atteinte est le plus souvent unilatérale et associée à un étirement des procès ciliaires et à une microphthalmie dans un tiers des cas. Les atteintes bilatérales sont rares et souvent associées à la trisomie 13 (Green, 1998). En absence de traitement efficace, cette maladie peut évoluer naturellement vers une cataracte, un glaucome, créant une hémorragie intraoculaire. Dans les cas extrêmes, elle entraîne un décollement de la rétine (Nayak G et al., 2018; Saint-Geniez et al., 2004).

#### **1.4.1.5 Traitement des vitrorétinopathies**

À la différence des autres rétinopathies, la prise en charge des vitrorétinopathies est difficile, car dans la plupart du temps, les patients naissent avec un décollement complet de la rétine. Dans cette situation, le traitement permettant la prévention de la perte de vision est presque impossible. Les patients qui ne présentent pas un décollement de la rétine bénéficient d'une chirurgie ou d'une photocoagulation au laser (Balmer et al., 2005). De ce qui précède, les traitements actuels ne permettent pas une guérison totale des rétinopathies de façon générale, encore moins des vitrorétinopathies. Certes, les progrès scientifiques ont permis d'améliorer la prise en charge des rétinopathies, cependant les traitements permettent simplement de retarder la pathologie, d'où l'urgence d'explorer d'autres voies de traitement.

### **1.5 Rationnel de l'étude**

Au cours du développement embryonnaire de l'œil, les vaisseaux sanguins fœtaux transitoires (hyaloïdes) apportent l'oxygène et les nutriments essentiels au bon développement de la rétine et de l'œil. Dans le processus de développement normal de l'œil, ces vaisseaux hyaloïdes sont programmés pour régresser simultanément à la formation des vaisseaux rétinien définitifs qui alimentent par la suite l'œil. Toutefois, lorsqu'il y a dysfonctionnement dans ce processus, les vaisseaux hyaloïdes persistent de façon anormale, entraînant alors des défauts de vascularisation à l'origine de certaines rétinopathies.

Plusieurs études ont montré que la signalisation Wnt et la signalisation VEGF sont impliquées dans le processus de formation du réseau vasculaire rétinien (Cross *et al.*, 2003; Suchting et al., 2007). Il est également connu que la signalisation Notch1 joue un rôle primordial dans l'angiogenèse rétinienne et qu'une défaillance de cette signalisation engendre un grave défaut de vascularisation

responsable de plusieurs rétinopathies (Suchting *et al.*, 2007). Cependant, le rôle de Notch1 dans la persistance des vaisseaux fœtaux (hyaloïdes) chez l'humain reste mal connu et peu étudié.

La sénescence, tout comme la signalisation Notch, est un phénomène fortement impliqué dans les processus biologiques développementaux (Daniel *et al.*, 2013). Il est connu qu'elle joue un rôle prépondérant dans la croissance et la prolifération cellulaire en sécrétant des molécules permettant de contrôler le cycle cellulaire et de contrôler la prolifération (Muñoz-Espín et Serrano, 2014). Toutefois, son rôle lors de la régression du réseau vasculaire hyaloïde est également méconnu.

En conséquence, le but de ce projet est de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires de la signalisation Notch1 au cours des rétinopathies ischémiques et vitroétinopathie.

## **1.6 Hypothèse**

Notre hypothèse est que la voie de signalisation Notch1 est essentiel dans la régression développementale des vaisseaux hyaloïdes.

## **1.7 Objectifs**

Afin de vérifier cette hypothèse, nos objectifs sont les suivants :

1. Déterminer l'expression et l'activité de Notch1 à différents stades de la régression physiologique du réseau vasculaire hyaloïde.
2. Élucider la relation entre Notch1 et la sénescence dans ce processus de régression des vaisseaux hyaloïdes
3. Caractériser le rôle de Notch1 lors de la régression physiologique des vaisseaux hyaloïdes, mais également lors de la régression pathologique dans une ischémie rétinienne grâce à la microscopie confocale, Westen Blot et la RT-qPCR.

## CHAPITRE 2

### Matériels et méthodes

#### 2.1 Animaux

Les manipulations effectuées sur les souris dans le cadre de ce projet ont été approuvées par le Comité institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) de l'Université du Québec à Montréal (UQAM) accrédité par le Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA). Pour étudier les effets d'une déficience de Notch1, des souris avec le premier exon du gène Notch1 flanqué de site de recombinaison LoxP (Notch1<sup>fl/fl</sup>) et des souris portant une séquence codante pour la Cre-recombinase inducible par le tamoxifène (Cre-ERT2) sous le promoteur d'un gène spécifique aux cellules endothéliales Cadherine5 (Cdh5) ont été générées à partir de couples reproducteurs initialement achetés du laboratoire Jackson (Québec, Montréal). Les deux souches étaient de fond génétique C57BL/6J. À l'issue d'un premier croisement entre des souris Notch<sup>(fl/fl)</sup> et des souris Cdh5CreERT2, des souris doubles hétérozygotes Notch<sup>+</sup>-Cdh5CreERT2<sup>+/-</sup> ont été croisées entre elles pour obtenir des souris homozygotes pour l'allèle floxé de Notch1 (Notch<sup>fl/fl</sup>-Cdh5CreERT2<sup>+/-</sup>). Ces souris ont été ensuite croisées entre elles pour générer les souriceaux (Notch<sup>fl/fl</sup>-Cdh5CreERT2<sup>+/-</sup>) de différents âges (prénataux et postnataux) pour injection au tamoxifène.

##### 2.1.1 Traitement au tamoxifène

Pour permettre l'activation de la Cre recombinase, une solution mère de tamoxifène (4-hydroxytamoxifène; Sigma-Aldrich T5648-1G, Darmsadt, Allemagne) a été préparée par dissolution de 1mg de tamoxifène dans 5µl d'éthanol. Après dissolution, 1ml d'huile de maïs a été ajouté puis la solution a été laissée sous la hotte à l'abri de la lumière pendant 7 à 8 heures pour permettre l'évaporation de l'éthanol. Pour supprimer sélectivement Notch1 dans les cellules endothéliales de l'œil, des souris Notch<sup>fl/fl</sup>-Cdh5CreERT2<sup>+/-</sup> ont reçu dans l'estomac (identifié par la présence d'un dépôt de lait), une injection de 50µl de tamoxifène (1mg/ml) du jour postnatal 0 (0) au jour postnatal 4 (4). À la suite de ce traitement, les souris déficientes pour Notch1 sont appelées Notch1<sup>CKO</sup>.

## **2.1.2 Génotypage et sexage**

Les souris ont été utilisées sans discrimination de sexe. Pour le transgène Notch1(flox), des poinçons d'oreilles ont été génotypés par PCR avec l'ADN polymérase (Diamed, Cat : AD100-11102) et des amorces bordant le site d'insertion du transgène (5' -TGC CCT TTC CTT AAA AGT GG- 3' et 5' -GGT ACC CG GGT TTT CGA TT- 3'). Le programme utilisé consiste en une dénaturation initiale de 3 minutes à 96°C, puis 35 cycles de 30s à 96°C, 30s à 52°C et 1min à 72°C, avec une élongation finale de 5 min à 72°C. Le programme suivant a été utilisé pour la PCR du gène Cdh5Cre : 3 minutes à 96°C, puis 35 cycles de 30s à 96°C, 30s à 52°C et 1min à 72°C, avec une élongation finale de 7 min à 72°C. La paire d'amorces utilisées à cet effet est la suivante : Mousse Notch-Floxed. Ch5-Cre (5'-GAT GAG GTT CGC AAG AAC CTG ATG- 3' et 5'-GAT GAG GTT CGC AAG CTG ATG-3').

## **2.1.3 Prélèvement des différents tissus**

### **2.1.3.1 Prélèvement des yeux post-nataux pour l'immunofluorescence**

Les prélèvements postnataux ont été réalisés sur des souris à P0, P4, P8, P14 et P21. Les souris à P0, P4 et P8 ont été sacrifiées par décapitation et les souris de stades postérieures ont été anesthésiées à l'isoflurane (5%) et euthanasiées par inhalation de au MgCl<sub>2</sub> (20 à 30%) puis les yeux ont été énucléés. Un trou avec une aiguille G26 a été réalisé à travers la cornée, puis les échantillons ont été fixés à 4% de Paraformaldéhide (PFA) pendant 1 heure. Ensuite, trois lavages de 5 minutes au PBS ont été réalisés et les yeux ont été utilisés immédiatement à température ambiante ou conservés à 4°C dans du PBS pour une utilisation ultérieure.

### **2.1.3.2 Prélèvement des yeux prénataux pour l'immunofluorescence**

Les femelles gestantes ont été euthanasiées au jour 18.5 après fécondation identifié par la présence d'un bouchon vaginal (plug). Une large incision a été faite dans l'abdomen, puis les cornes utérines ont été exposées et les fœtus ont été extraits de leurs sacs amniotiques. Ces derniers ont été décapités, leurs yeux ont été prélevés, puis fixés dans 4% de PFA pendant 1 heure; puis trois lavages de 5 minutes au PBS sont réalisés. Les yeux ont été utilisés immédiatement ou conservés dans du PBS à 4°C pour une utilisation ultérieure.

### **2.1.3.3 Prélèvement des rétines pour la protéinémie**

Pour l'analyse des protéines par Western Blot, les yeux ont été prélevés tels que précédemment. Après trois lavages au PBS; la cornée, la sclère et l'épithélium pigmentaire (RPE) ont été retirées pour isoler la rétine et le cristallin. Un lavage avec du PBS 1X stérile a permis d'enlever le reste du RPE. Après retrait du cristallin, la rétine a été collectée puis conservée à -80°C jusqu'à une utilisation ultérieure.

### **2.1.3.4 Prélèvement des hyaloïdes**

Le prélèvement des vaisseaux hyaloïdes a été réalisé de façon similaire à celui de la rétine (2.1.3.3). Après avoir retiré la rétine cornée, la sclère, la RPE et la choroïde, le cristallin a été isolé et les vaisseaux hyaloïdes bordants ont été délicatement retirés et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

## **2.1.4 Immunofluorescence**

### **2.1.4.1 Rétine**

Les yeux sont préalablement fixés à 4% de PFA (**voir dissection des yeux**). Les rétines ont été disséquées suivant la technique d'isolement de la rétine (**voir dissection rétine**) (Figure 2.1). Après trois lavages de 5 minutes avec du PBS, les rétines ont été perméabilisées pendant une heure à température ambiante dans une solution de perméabilisation-blocage (1% sérum bovin fœtal (FBS), 3% sérum bovin albumine (BSA), 0.5% triton X-100 et 0.01% sodium déoxycolate dans du PBS, pH 7.4). Ensuite, les rétines ont été incubées dans une solution de perméabilisation-blocage avec l'isolectine B4 (Ref RL-1102) (1 :200) pendant deux heures à température ambiante. Trois lavages de dix minutes ont été effectués puis les rétines ont été incubées dans une solution de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (1 :10000) pendant cinq minutes. Un autre lavage de 10 minutes a été réalisé. Par la suite, une goutte de fluoromount (Thermo Fisher 00-4958-02, Canada) a été ajoutée à la préparation et un montage à plat a été réalisé entre lame et lamelle (Figure 2.1e, f). Les images ont été prises avec un microscope confocal de la compagnie NIKON ECLIPSE Ti (Agilent Technologies MLC 400).

### 2.1.4.2 Vaisseaux hyaloïdes

Les rétines et les cristallins ont été disséqués tels que décrits précédemment (2.1.3.1) en conservant la rétine et le cristallin (Figures 2.1b, c, d, e, g, h). Les rétines ont été incubées pendant une heure à température ambiante dans une solution de perméabilisation-blocage (10% FBS, 1% triton X-100 et 0.01M glycine dans du PBS pH 7.4). Après une heure, les rétines ont été incubées dans la solution de perméabilisation-blocage avec l'isoelectine B4 (1 :200) (Ref RL-1102, USA, Californie) pendant deux heures à température ambiante. Trois lavages de dix minutes d'intervalle ont été effectués puis les rétines ont été incubées dans une solution de DAPI (1 :10000) pendant cinq minutes. Un autre lavage de dix minutes a été effectué.

Après le marquage, les rétines ont été incubées dans 2% d'agarose ultra low melt (cat :800-016-TC) et maintenues dans un incubateur (37°C) avec une humidité relative toute la nuit pour permettre la diffusion graduelle du gel dans les hyaloïdes. Le lendemain, les rétines ont été placées à 4°C pendant quatre heures.

Par la suite, les rétines ont été extraites de l'agar. Enfin le montage à plat des hyaloïdes a été réalisé dans une goutte de fluoromount entre lame et lamelle (Figures 2.1d, g, h). Les images ont été prises avec le microscope confocal de la compagnie NIKON ECLIPSE Ti (Agilent Technologies MLC 400).

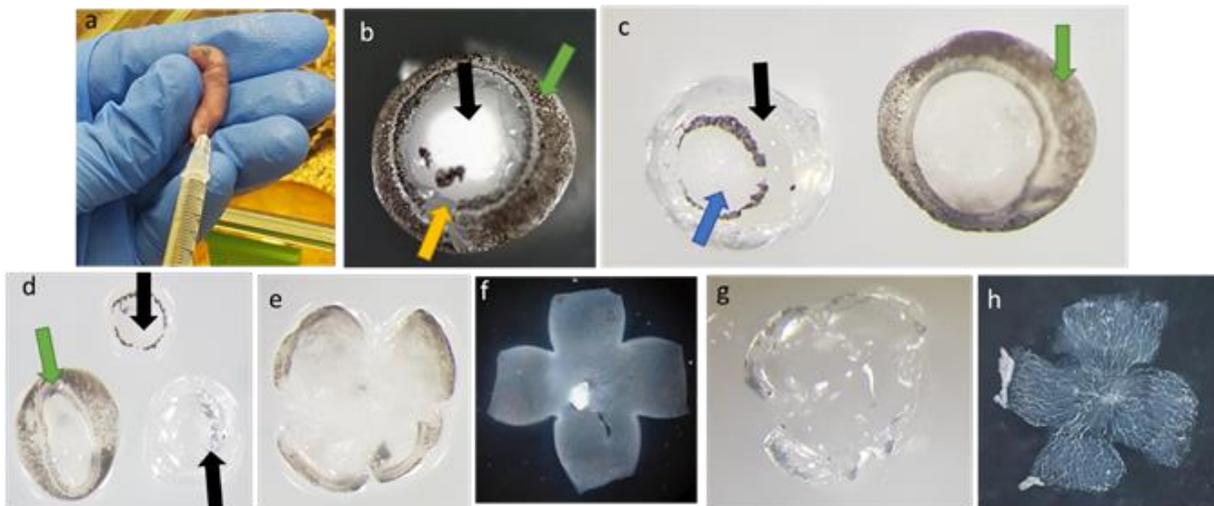


Figure 2.1 : Procédure d'injection au tamoxifène et technique de dissection de la rétine et des hyaloïdes. a) Injections intragastrique du tamoxifène. b) Œil débarrassé de la sclère, cornée et la RPE. La flèche noire indique le cristallin, la flèche jaune indique les hyaloïdes et la flèche verte indique la rétine. c) Cristallin entouré des vaisseaux hyaloïdes extraits de la rétine (flèche noire). d) Isolement des hyaloïdes, de la rétine et du cristallin. e, f) Montage à plat de la rétine. g, h) Montage à plat des hyaloïdes.

### **2.1.5 Test de prolifération**

À jour postnatal P8, les souris ont reçu une injection intrapéritonéale de 5mM d'5-éthynyl-2'-déoxyuridine (EdU) (Invitrogen, Cat : C10337 ). Après 6 heures, les yeux des souris ont été prélevés puis fixés avec 4% de PFA pendant 1heure à température pièce (TP). Par la suite, ils ont été perméabilisés pendant 1heure à TP et ont été marqués avec l'anticorps secondaire anti-mousse (Alexa Fluor 488).

### **2.1.6 Analyse par cytométrie en flux**

L'analyse de l'apoptose de cellules des vaisseaux hyaloïde (Annexine V, iodure de propidium ; Biolegend cat. 640914) a été effectuée selon les instructions du fabricant et comme précédemment rapporté, les hyaloïdes ont été isolés suivant le protocole de dissociation décrit en 2.1.6.1. Par la suite, les suspensions cellulaires ( $1 \times 10^6$ ) ont été incubées à l'Annexine-A5-FITC/PI (1 :200). Les échantillons ont été analysés par cytométrie en flux. Les FACS a été réalisé sur le dispositif BD Accuri™ C6 et les données ont été analysées à l'aide logiciel BD Accuri C6 Software 1.0.264.21.

### **2.1.7 Isolation de l'ARN et PCR quantitative à temps réel**

Extraction de l'ARN provenant de cellules en culture, des rétines ainsi que des hyaloïdes ont été obtenus en utilisant le TRizol (Invitrogen) suivi d'un traitement à la DNase I (QIAGEN) afin d'enlever les contaminants d'ADN. Une quantification de l'ARN a été réalisée au Nanodrop. L'ARN a ensuite été converti en cDNA utilisant la M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). Des amorces de souris pour le Notch1, NICD, Pai1, p53, p16, p21 de la compagnie Abclonal ont été utilisées (voir tableau 1, 2).

L'analyse quantitative de l'expression génique a été réalisée avec un Bio-Rad CFX Maestro et le SYBR Green Master mix kit (BioRad). Les valeurs de chaque gène ont été normalisées avec les niveaux d'expression de la  $\beta$ -actin. Les paires d'amorces spécifiques utilisées (Forward/Reverse) sont consignées dans les tableaux suivants :

Tableau 2.1: Tableau des oligonucléotides utilisés pour les réactifs de RT-qPCR d'origine murine

Souris				
Nom	Forward (F)	Reverse (R)	Compagnie	Catalogue
Notch1	TGT GGC TTC CTT CTA CTG CG	CTT TGC CGT TGA CAG GGT TG	Invitrogen	10336022
p21	GTT CCT TGC CAC TTC TTA CCT	TCA TCC TAG CTG GCC TTA GA	Invitrogen	10336022
p16	CTC ACC TCG CTT GTC ACA GT	TCG CAC GAA CTT CAC CAA GA	Invitrogen	10336022
Pai1	CCG ATG GGC TCG AGT ATG AC	TTC TCA AAG GGT GCA GCA GCG AT	Invitrogen	10336022
p53	CCT CTC CCC CGC AAA AGA AA	GGC CCC ACT TTC TTG ACC AT	Invitrogen	10336022
B-actin	CCA CAG GAT TCC ATA CCC AAG AG	GAC GGCC CAG GTC ATC ACT ATTG	Invitrogen	10336022

Tableau 2.2: Fournisseur, les numéros de catalogue et les séquences d’amorces pour les gènes d’origine humaine utilisés.

Humain				
Nom	Forward (F)	Reverse (R)	Compagnie	Catalogue
Notch1	GGA CGT CAG ACT TGG CTC AG	ACA TCT TGG GAC GCA TCT GG	Invitrogen	10336022
p21	TCC TAA CTG ATG CTG GGT GG	CTG GTG CTT GTC TCT AGC CC	Invitrogen	10336022
p16	GGG TCG GGT AGA GGA GGT G	GCT GCC CAT CAT CAT GAC CT	Invitrogen	10336022
Pai1	GAC CTC AGG AAG CCC CTA GA	TGG AGA GGC TCT TGG TCT GA	Invitrogen	10336022
p53	TGA CAC GCT TCC CTG GAT TG	GCT CGA CGC TAG GAT CTG AC	Invitrogen	10336022
B-actin	GTC ATT CCA AAT ATG AGA TGC GT	TGT GGA CTT GGG AGA GGA CT	Invitrogen	10336022

## 2.1.8 Culture cellulaire

### 2.1.8.1 Fibroblastes

Pour la dissociation et la mise en culture des fibroblastes, 13 jours après la fécondation, la femelle gestante a été anesthésiée par l’isoflurane puis sacrifiée par dislocation cervicale. Les fœtus ont été ensuite extraits de leurs sacs amniotiques tels que décrits au paragraphe 2.1.3.2. Ces derniers ont été mis dans un pœtri contenant du PBS 1X stérile et froid. Sous l’hôte, les embryons ont été retirés

du placenta et lavés avec du PBS stérile et froid. Par la suite, les pattes, la queue, le foie, le cœur et la tête ont été retirés et la queue a été prélevée à des fins de génotypage.

Le reste du corps a été lavé avec du PBS 1X stérile. L'embryon a été découpé en petits morceaux avec un scalpel dans 2ml de trypsine 0.5% puis incubé pendant 10 minutes à 37°C. À la fin de l'incubation, 10 mL de milieu complet DMEM complet (WISENT INC, cat : 319-005-CL) ont été ajoutés. Le contenu du pétri a été transvasé dans un tube de 15 ml et laissé reposer 5 minutes, puis le surnageant a été récupéré et mis en culture dans un pétri de 100 mm. La culture cellulaire a été réalisée dans un environnement humide à 37°C, en présence de 5% CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture a été changé tous les 2 jours et les cellules ont été trypsinées (Trypsine 0.25% avec EDTA 2.21 mM (325-043-CL, Wisent bioproducts)) à l'atteinte de 90% de confluence. Les cellules ont été gardées à l'oxygène (O<sub>2</sub> 3%, O<sub>2</sub>75%) afin d'induire des stress.

#### **2.1.8.2 Cellules endothéliales aortiques humaines (HAEC)**

Ces cellules d'origine humaines ont été cultivées dans du milieu basal Lonza Clonetics™ Endothelial Cell System supplémenté par un kit EGM™-2 BulletKit™ milieu contenant facteur de croissance épidermique humain (hEGF), 0.5 ml; facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), 0.5ml; facteur de croissance (R3-IGF-1), 0.5 ml; acide ascorbique, 0.5 ml; hydrocortisone, 0.2 ml; facteur de croissance beta des fibroblastes humains (hFGF-β), 2.0 ml; sérum bovin fœtal (FBS), 25.0 ml; Gentamicine/Amphotéricine-B (GA), 0.5ml. Le milieu de culture a été changé tous les 2 jours et les cellules ont été trypsinisées (Trypsine 0.025% avec EDTA 2.21mM (325-043-CL, Wisent bioproducts)) à l'atteinte de 90% de confluence. Les cellules ont été stimulées à l'oxygène (O<sub>2</sub> 3%, O<sub>2</sub> 75%) afin d'induire des stress.

#### **2.1.8.3 Cellules endothéliales de la veine ombilicale Human Umbilicale humaine (HUVEC)**

Ces cellules d'origine humaines ont été cultivées dans du milieu basal Lonza EGM™-PLUS BulletKit™ avec des éléments supplétifs par un kit EGM™-2 BulletKit™ milieu avec facteur de croissance épidermique humain (hEGF), 0.5 ml; facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), 0.5ml; facteur de croissance (R3-IGF-1), 0.5 ml; acide ascorbique, 0.5 ml; Hydrocortisone, 0.2 ml; facteur de croissance beta des fibroblastes humains (hFGF-β), 2.0 ml; sérum bovine foetal (FBS), 25.0 ml; Gentamicin/Amphotericin-B (GA), 0.5ml. Le milieu de

culture a été changé tous les 2 jours et les cellules ont été trypsinisées (Trypsine 0.025% avec EDTA 2.21mM (325-043-CL, Wisent bioproducts)) à l'atteinte de 85 à 90% de confluence. Les cellules ont été stimulées (O<sub>2</sub> 3%, O<sub>2</sub> 75%) afin d'induire des stress.

### **2.1.9 Western Blot**

Les échantillons de rétines, de vaisseaux hyaloïdes ou des cellules ont été broyés dans 70µl tampon de lyse NP40 (1% Nonidet P40, 0,1% SDS, 50 mM Tris base, 0,1 mM EDTA, 0,1% EGTA, 0,1% acide déoxycholique, Ph 7,4) et contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéase et d'inhibiteurs de phosphatase de Sigma, NaF (20mM), phosphore de sodium (Nap) (1mM), oxyde de sodium (NaO) (1mM). La concentration en protéines a été déterminée par dosage BCA (Biorad) et 30 µg ont été séparés par électrophorèse sur gels SDS-polyacrylamide 12% pendant 1 heure à 120V. Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été préalablement incubées pendant 1 heure dans une solution de 5% BSA ou de 5% du lait dans du tampon tris salin (TBS) selon la nature de l'anticorps afin de permettre le blocage des sites protéiques. Ensuite, les membranes ont été laissés à 4°C toute la nuit dans 2,5% de lait ou 2.5% de BSA avec anticorps primaires (1 : 500) (tableau 3). Après incubation avec les anticorps primaires, les membranes ont été lavées 3 fois 10 minutes au TBST puis incubées avec des anticorps secondaires (1 : 3000) (lapin ou souris) pendant 1 heure à température pièce. Par la suite, les membranes ont été révélées avec le Fusion-X (chimioluminescence) avec le Kit ECL (Bio-Rad, no cat : 10026385Rev) et les intensités des bandes ont été quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ. L'intensité relative des protéines cibles a été exprimée après normalisation selon l'intensité de la β-actine.

Tableau 2.3: Tableau montrant la compagnie, nature et les numéros de catalogue des anticorps utilisés

Nom	Compagnie	Catalogue	Dilution	Source
Notch1	Cell Signaling	D6F11	1/500	Rabbit mAb
NICD	Cell Signaling	(Val1744) (D3B8)	1/500	Rabbit mAb
p16 INK4A	Cell Signaling	D7C1M	1/1000	Rabbit mAb
p21	ABclona	A1483	1/1000	Rabbit mAb
p53	Cell Signaling	1C12	1/1000	Rabbit mAb
Pai1	Cell Signaling	D9C4	1/1000	Rabbit mAb
Phospho-Histone H2AX-S139	ABclona	AP0099	1/300	Rabbit mAb
B-actin	Cell Signaling	8H10D10	1/2000	Mouse mAb

## 2.1.10 Marquage à la x-galactosidase

### 2.1.10.1 Rétine

Les rétines, les hyaloïdes ou les cellules ont été fixées (PFA 4%) à température ambiante pendant quinze à vingt minutes. Trois lavages de cinq minutes au PBS ont été effectués. Par la suite, les rétines, les hyaloïdes et les fibroblastes embryonnaires ont été incubées dans le MgCl<sub>2</sub>/PBS (pH 5) tandis que les HUVEC et HAEC ont été incubées dans du MgCl<sub>2</sub>/PBS (pH 6) toute la nuit à 4°C. Le lendemain, le MgCl<sub>2</sub>/PBS 1x (pH 5) a été remplacé par une solution (X-gal (40x), KC (20X) et

du  $\text{MgCl}_2/\text{PBS}$  1x (pH 5)). Par la suite, les rétines ont été incubées à  $37^\circ\text{C}$  avec 5%  $\text{CO}_2$  et une humidité relative. Après quatre à cinq heures, les rétines ont été lavées une fois pendant 10 minutes à l'eau stérile puis trois fois 5 minutes au PBS. Pour finir, les rétines ont été disséquées et montées à plat entre lame et lamelle avec une goutte de fluoromount. Les lames ont été scellées avec du vernis transparent.

### **2.1.11 Analyses statistiques**

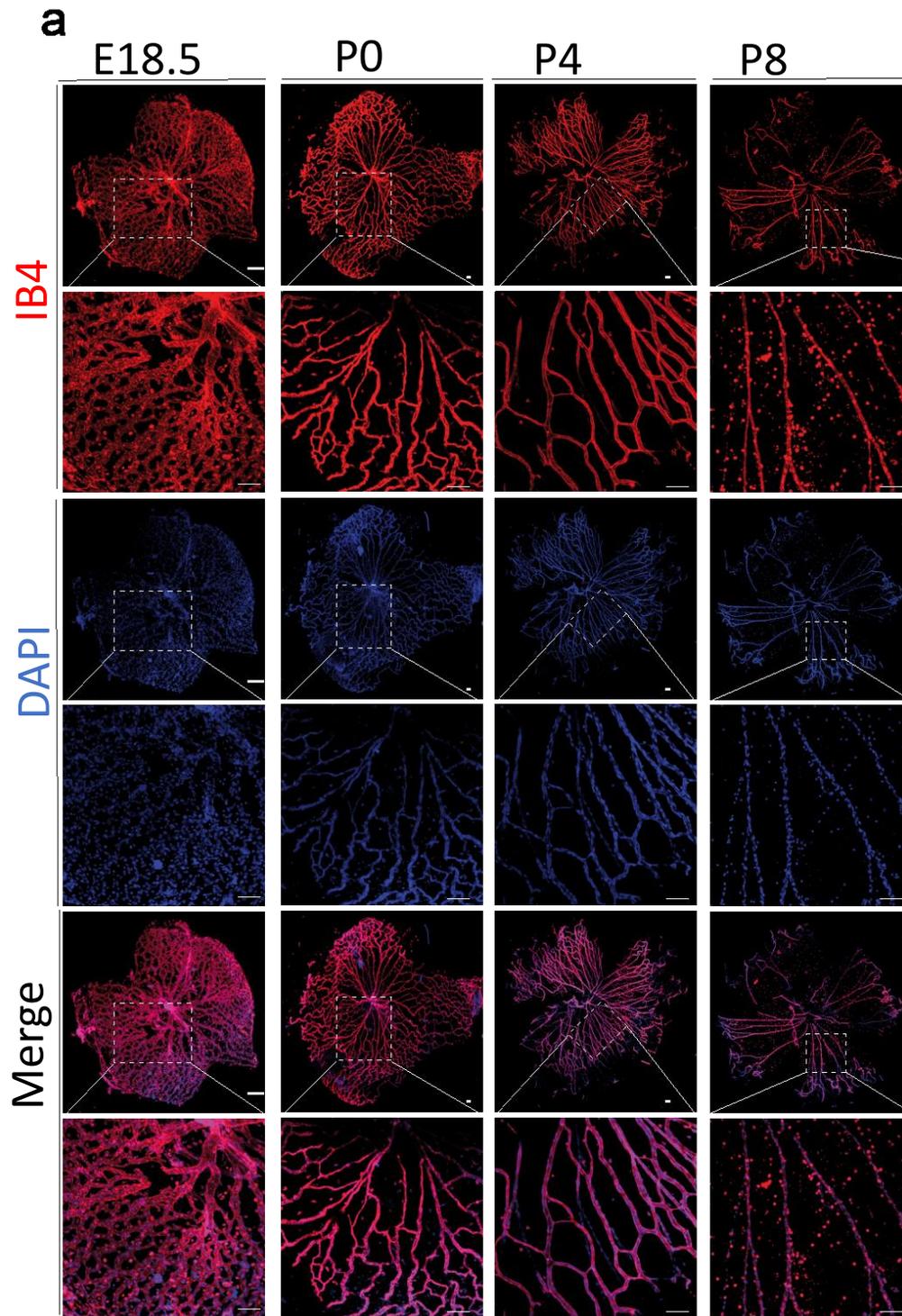
Les différents paramètres vasculaires ont été obtenus avec le logiciel imageJ et le logiciel Angio Tool 0.6a. Les valeurs statistiques ont été analysées à l'aide de GraphPad\_Prism\_8.0.2.263. Pour déterminer si les distributions varient par rapport aux ratios théoriques attendus, des tests de  $\chi^2$  de conformité ont été réalisés. Les distributions étaient considérées significativement différentes si la valeur du P obtenu était inférieure 0,05.

## CHAPITRE 3

### Résultats

#### 3.1 Régression du réseau vasculaire des hyaloïdes chez la souris

Chez la souris, les vaisseaux fœtaux transitoires (hyaloïdes) sont complètement formés au jour embryonnaire 10.5 (E10.5). Ces vaisseaux commencent leur régression dès la naissance (P0) de telle sorte qu'approximativement trois semaines postnataux (P21), les vaisseaux hyaloïdes ont complètement disparu (Kishimoto et al., 2018). Il était donc intéressant de commencer par la validation de la régression développementale du réseau vasculaire des hyaloïdes avant et après la naissance dans notre modèle de souris (Figure 3.1a). Pour se faire, des yeux de souris embryonnaires (E18.5) et postnataux (P0, P4 et P8) ont été prélevés puis marqués à l'isoelectine (IB4) et au DAPI, afin de visualiser l'état du réseau vasculaire hyaloïde dans le fond génétique murin à l'étude, C57Bl/6J. Les résultats des montages à plat ont concordé avec à la théorie : un réseau vasculaire très dense à E18.5 (Figure 3.1a), suivi d'une diminution significative et graduelle de la densité vasculaire à P0, P4 et P8 (Figure 3.1b). Ainsi, quatre jours après la naissance (P4) l'œil perd environ 1/3 des vaisseaux hyaloïdes. La densité vasculaire a diminué drastiquement à huit (8) jours après la naissance (Figures 1a, b). Les vaisseaux hyaloïdes ont totalement disparu après trois semaines de vie du murin (Figure supplémentaire 5). Il est intéressant de souligner que lors de cette régression, le diamètre des vaisseaux hyaloïdes a diminué à partir du stade E18.5 (Figures 3.1a, c). Notre modèle murin présente le processus de régression physiologique comme décrit dans la littérature (Wang *et al.*, 2019).



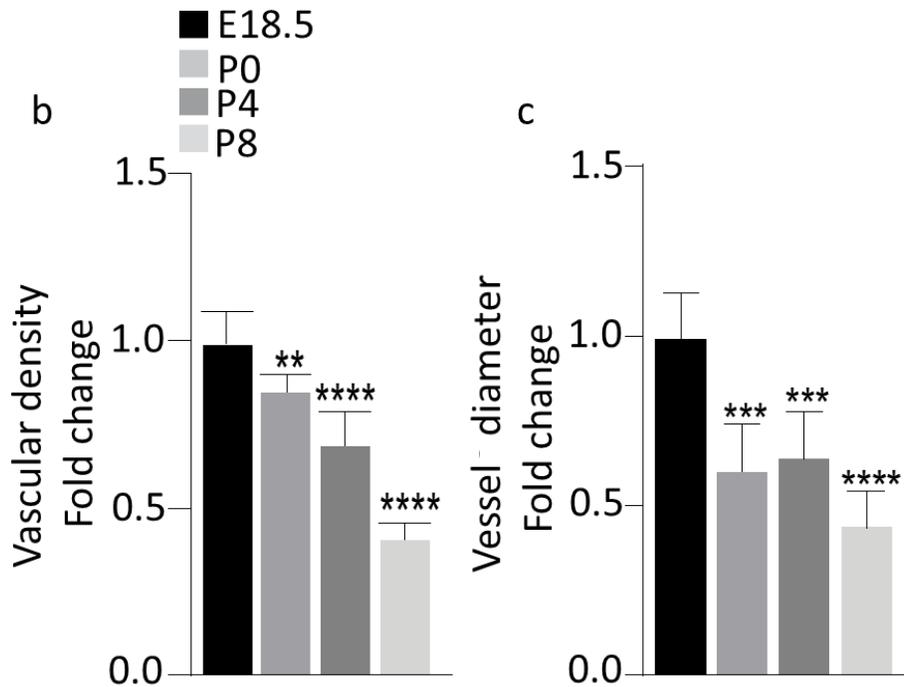


Figure 3.1 : Régression des vaisseaux hyaloïdes durant développement pré et postnatal.

(a) Développement physiologique du système vasculaire hyaloïde du jour prénatal (E18.5) au jour postnatal 8 (p8). Echelle= 100µm. Marquage à l'Isolectine (IB4) et au DAPI. (b) Évaluation quantitative de la densité vasculaire des hyaloïdes de E18.5 à P8 rapporté à E18.5. (d).E18.5 (n=7), P0 (n=12), P4 (n=9), P8 (n=13). (c) Diamètre (µm) des vaisseaux E18.5 (n=6), P0 (n=7), P4 (n=7), P8 (n=5). \*\*P≤0.01 \*\*\*P≤0.001 \*\*\*\*P≤0.0001 (T-test).

### 3.2 Sénescence et régression vasculaire chez la souris

La bêta-galactosidase associée à la sénescence (SA-B-Gal) catalyse l'hydrolyse des β-galactosides en monosaccharides uniquement dans les cellules sénescents. Elle a été utilisée dans une récente étude pour démontrer l'existence de la sénescence dans certains organes tels que les oreilles, le sac vitellin (Hosseinali-Sarjany, 2021; Muñoz-Espín *et al.*, 2013). De plus, de récents résultats (non publiés) de notre laboratoire révèlent un mécanisme de sénescence prématurée dans des cellules rétinienne, soulevant l'intérêt de déterminer s'il y a une sénescence dans les vaisseaux hyaloïdes lors de leur régression. Les résultats de marquage à la SA-β-Gal de E18.5 à P8 ont révélé de la sénescence (caractérisée par la couleur bleue) dans les vaisseaux hyaloïdes à tous les stades de leur régression physiologique (Figure 3.2a). La quantification de l'intensité de la SA-B-gal permet de voir de la sénescence prononcée à E18.5 et à P0 (Figure 3.2b). Cependant, elle diminue

significativement à P4 et P8 (Figure 3.2b). La sénescence semble être associée aux vaisseaux hyaloïdes en régression.

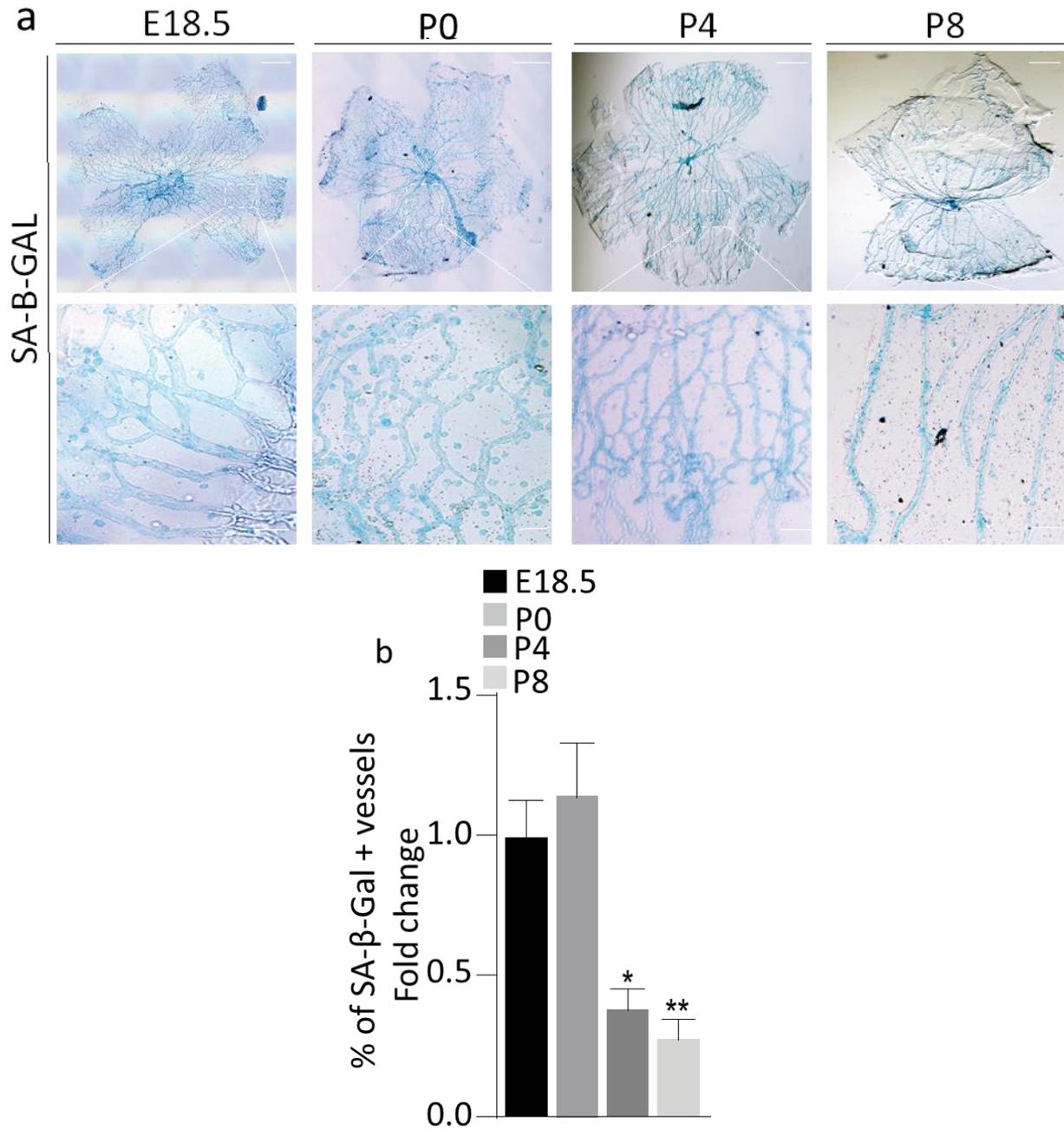
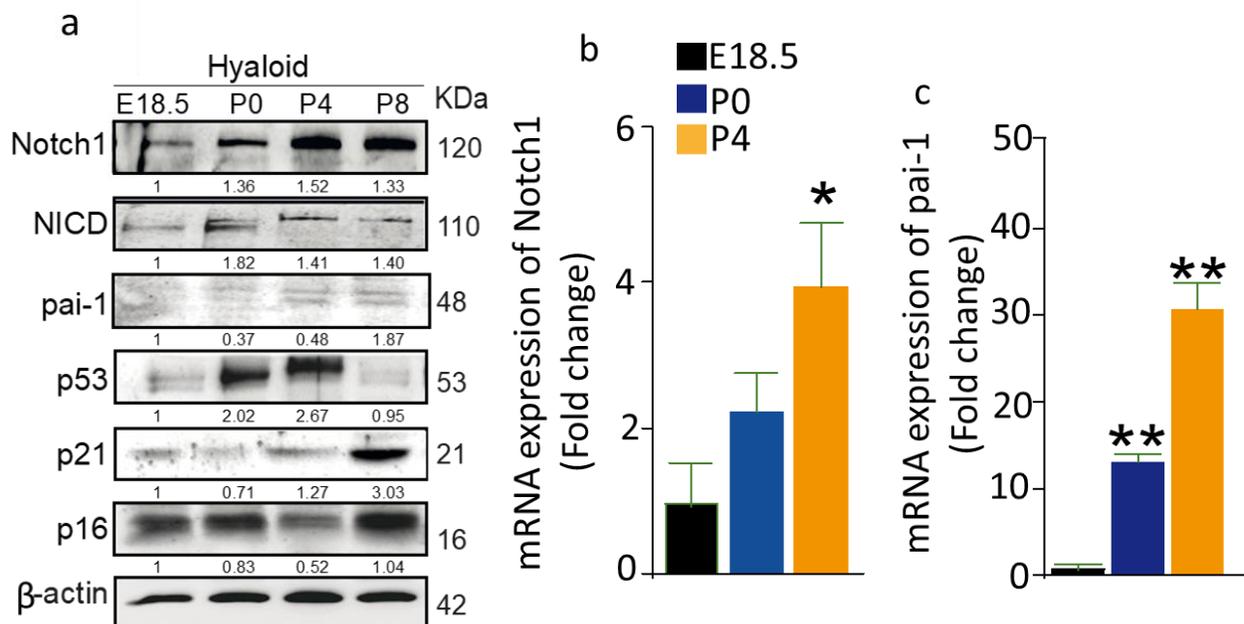


Figure 3.2 : Schémas illustratifs de l'expression de la SA-β-Gal dans les vaisseaux hyaloïdes. (a) Marquage SA-β-Gal de E18.5 à P8. Barre d'échelle = 100µm. (b) Quantification de l'intensité de la SA-β-gal par 100 µm de longueur de vaisseaux. \*\*P≤0.01 \*\*\*P≤0.001 \*\*\*\*P≤0.0001 (T-test).

La sénescence cellulaire se caractérise par l'expression de plusieurs protéines (p16, p21, p53 et Pai1) qui régulent la progression du cycle cellulaire (Schmitt *et al.*, 2002). Les niveaux d'expression de ces protéines et de leur ARNm lors de la régression des vaisseaux hyaloïdes ont été analysés par Western blot et RT-qPCR. Les résultats ont montré une expression élevée significativement de Pai1 et de son ARNm (Figures 3.3a, c) au cours de la régression vasculaire. Les protéines p53 et p21 étaient également exprimées à la hausse respectivement à P4 et à p8; l'expression de leurs ARNm était régulée à la baisse de manière non significative à p8 (Figures 3.3a, d, e, f). Pendant ce temps, l'expression de p16 tant au niveau protéique que génique était mitigées. Des études ont montré que la signalisation Notch1 déclencherait la sénescence dans les cellules endothéliales (Liu *et al.*, 2012). Il était donc intéressant d'étudier l'expression de Notch1 lors de la régression vasculaire des hyaloïdes qui exprime un phénotype de sénescence. Les résultats ont montré une expression croissante de Notch1 allant de E18.5 à P8 dans les lysats de vaisseaux hyaloïdes. L'expression du domaine intracellulaire de Notch1 (NICD) qui est la forme active de Notch1 a augmenté aussi (Figure 3.3a). Notch1 est donc exprimé en même temps que les marqueurs de sénescence, au cours de la régression des vaisseaux hyaloïdes.



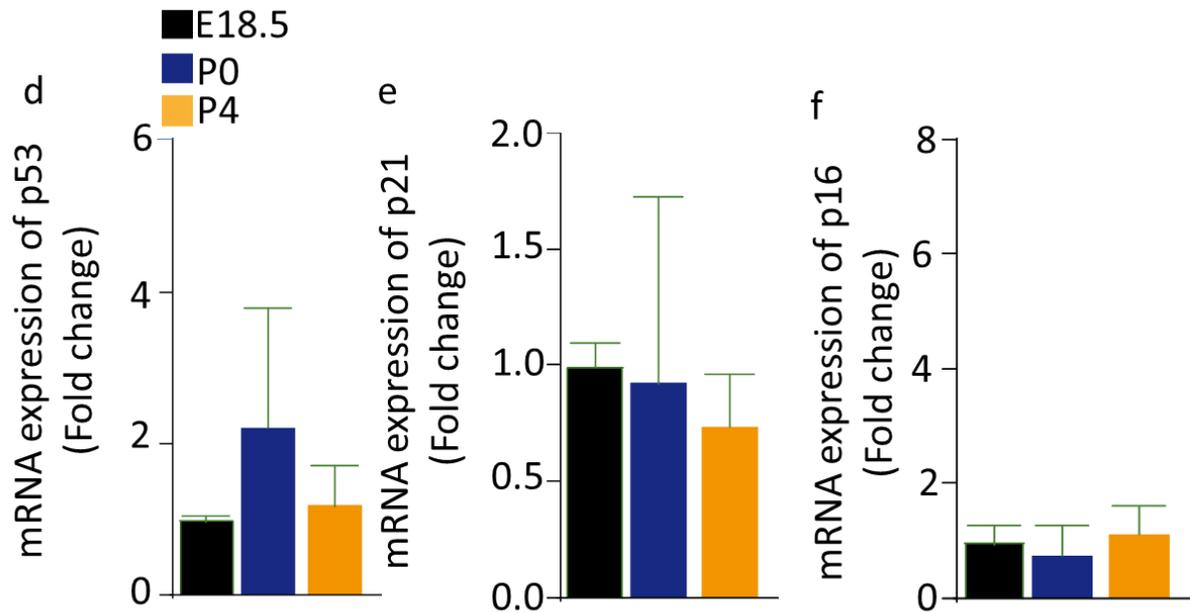


Figure 3.3 : Expression des marqueurs clés de la sénescence par Immunoblot et RT-qPCR de Notch1 et des marqueurs de sénescence dans des lysats de hyaloïdes.

(A). Immunoblot montrant l'expression de Notch1(n=4), NICD(n=2) et les marqueurs de sénescence dans le lysat des hyaloïdes : pai1 (n=3), p53 (n=3), p16 (n=2), p21 (n=3)). qRT-PCR de lysat de hyaloïdes révélant l'expression de l'ARNm Notch1(b) et des marqueurs de sénescence Pai1 (n=3), p53 (n=3), p16 (n=2), p21 (n=3) (c,d,e,f). \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001 \*\*\*\*P<0.0001 (T-test).

### 3.3 Modèle murin

Le système Cre de loxP est l'un des plus puissants outils génétiques utilisés pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires *in vivo* (Aissa, 2012). Afin d'étudier l'implication de Notch1 et sa relation de avec la sénescence au cours de la régression des vaisseaux hyaloïdes, nous avons généré une délétion conditionnelle de Notch1 spécifiquement dans les cellules endothéliales chez la souris en utilisant une Cre recombinase inducible (Cre-ERT) portée par un promoteur spécifique des cellules endothéliales, Cadhérine5 (Cdh5). Tout d'abord, afin de valider le modèle, nous avons croisé des souris transgéniques Notch1<sup>fl/fl</sup> et Cdh5-Cre (Figure 3.4A). Le génotypage a permis de sélectionner nos souris d'intérêt (Figure 3.4C). Les souriceaux ont reçu des injections de tamoxifène de P0 à P3 et ont été sacrifiés à P8 (Figure 3.4B). Les montages à plat rétines/ hyaloïdes réalisés à ce stade ont permis d'observer les vaisseaux rétines/ hyaloïdes des souris Notch1<sup>Cko</sup> (Figure 3.4D). Les résultats de qRT-PCR, réalisée avec des lysats de vaisseaux hyaloïdes de souris Notch1<sup>CKO</sup> (Notch1fl/fl : Cdh5Cre) montrent une expression de l'ARNm de Notch1

significativement diminuée chez les souris  $Notch1^{cKO}$  confirmant que la délétion réalisée est effective (Figure 3.4E).

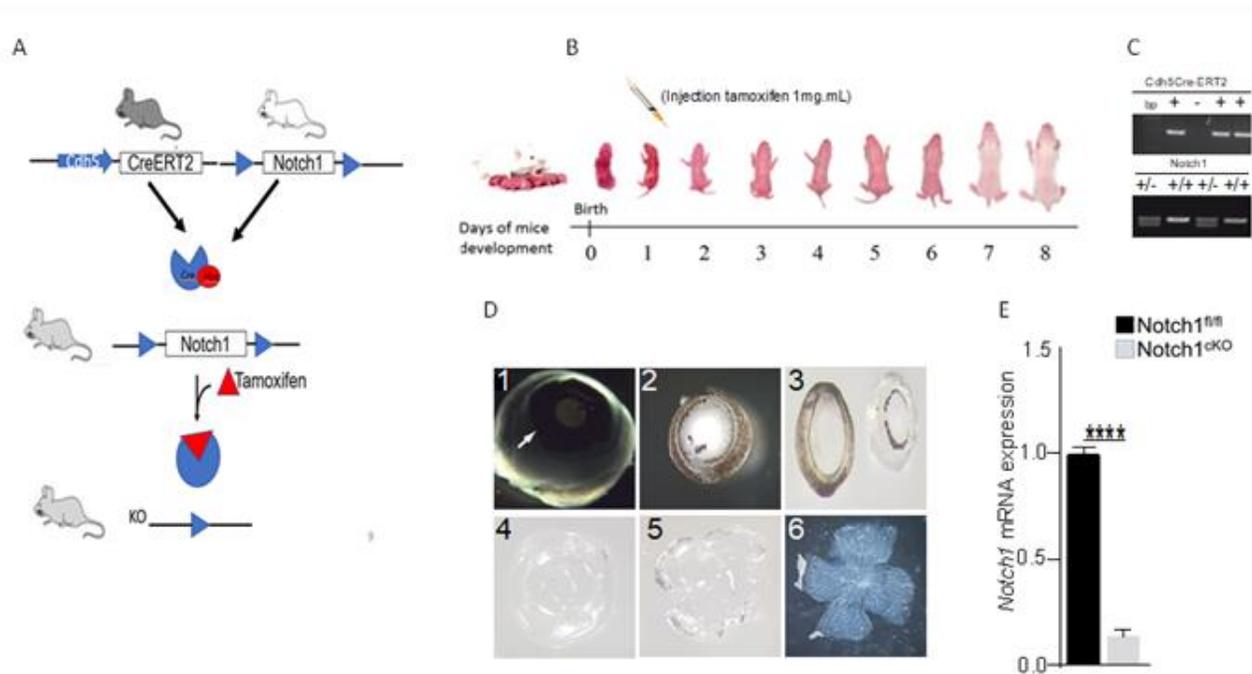


Figure 3.4 : Modèle animal.

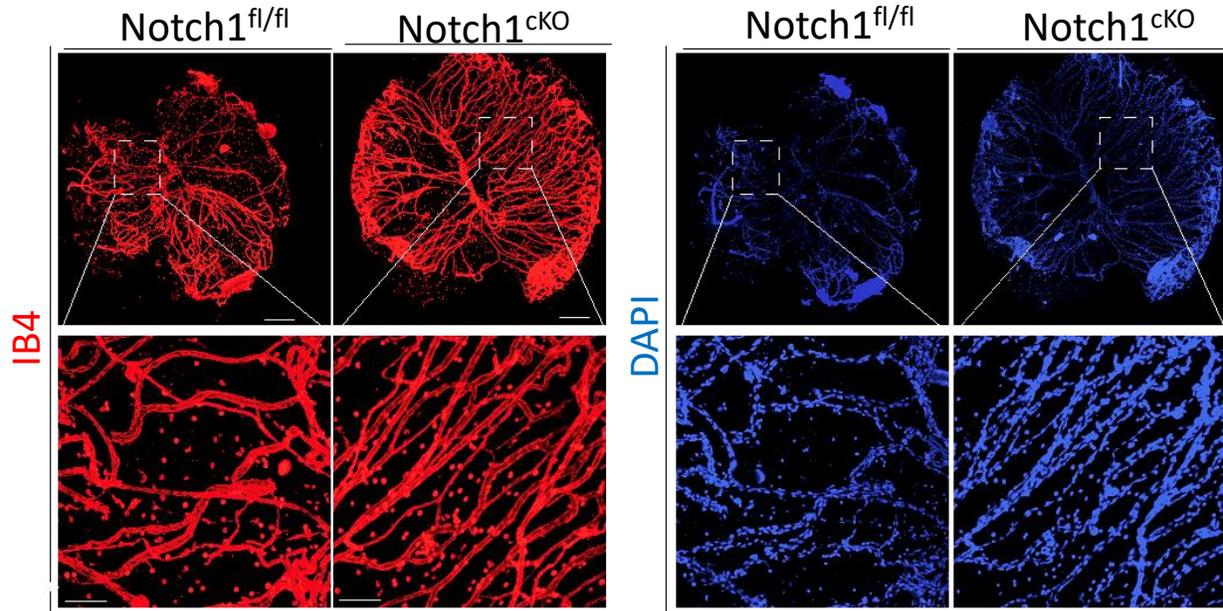
(A) Création des souris transgéniques (B) Injection intragastrique de tamoxifène. (C) Résultat de PCR pour le génotypage Cdh5Cre et de Notch1. (D) 1 Retrait de la cornée (flèche blanche). 2. Rétine contenant le cristallin et les hyaloïdes. 3 Isolement de la rétine. 4 Retrait des hyaloïdes contenu dans le gel. 5. Hyaloïdes coupés en quatre pétales. 6 Montage à plat des hyaloïdes. (E) qRT-PCR montrant l'expression de Notch1 dans P8 ( $Notch1^{fl/fl}$  et  $Notch1^{cKO}$ ) hyaloïdes.

### 3.4 L'inhibition de la voie de signalisation Notch1 entraîne une persistance anormale des hyaloïdes

Il est connu que le récepteur Notch1 joue un rôle majeur au cours du développement embryonnaire dans plusieurs organes dont l'œil notamment lors de l'angiogenèse (Suchting *et al.*, 2007). Des études ont montré que Notch1 est essentiel dans la mise en place du système vasculaire chez la souris à tel point que sa suppression très tôt au stade embryonnaire est létale (Limbourg *et al.*, 2005). Nous avons émis l'hypothèse que la signalisation Notch1 serait également importante dans le processus de régression des hyaloïdes. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé une délétion conditionnelle de Notch1 spécifiquement dans les cellules endothéliales de l'œil de souris

dès la naissance (P0). À jour huit postnatal (P8), les yeux ont été prélevés puis marqués à l'isoelectine (IB4) qui est un marqueur de veine et au DAPI qui marque le noyau (Figure 3.5a).

a.



b.

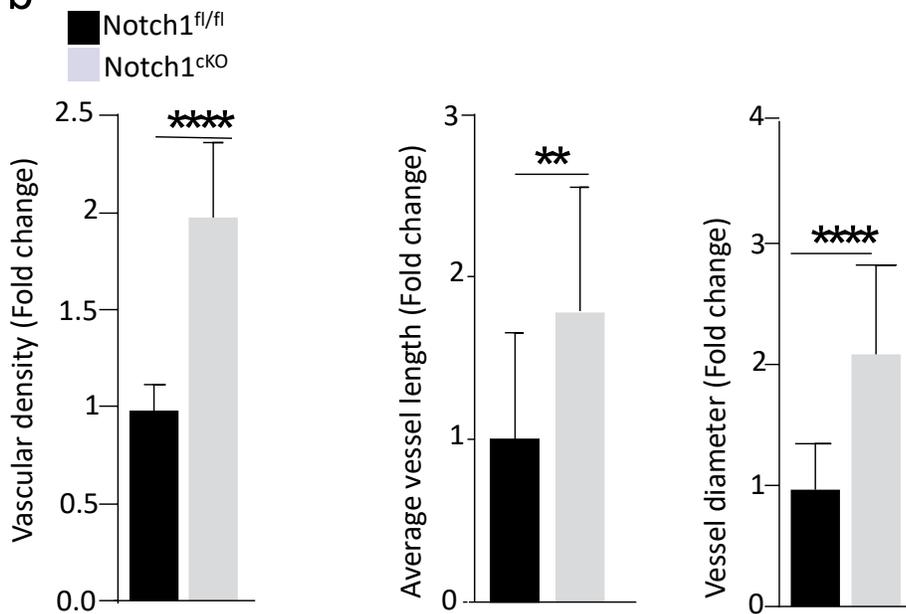


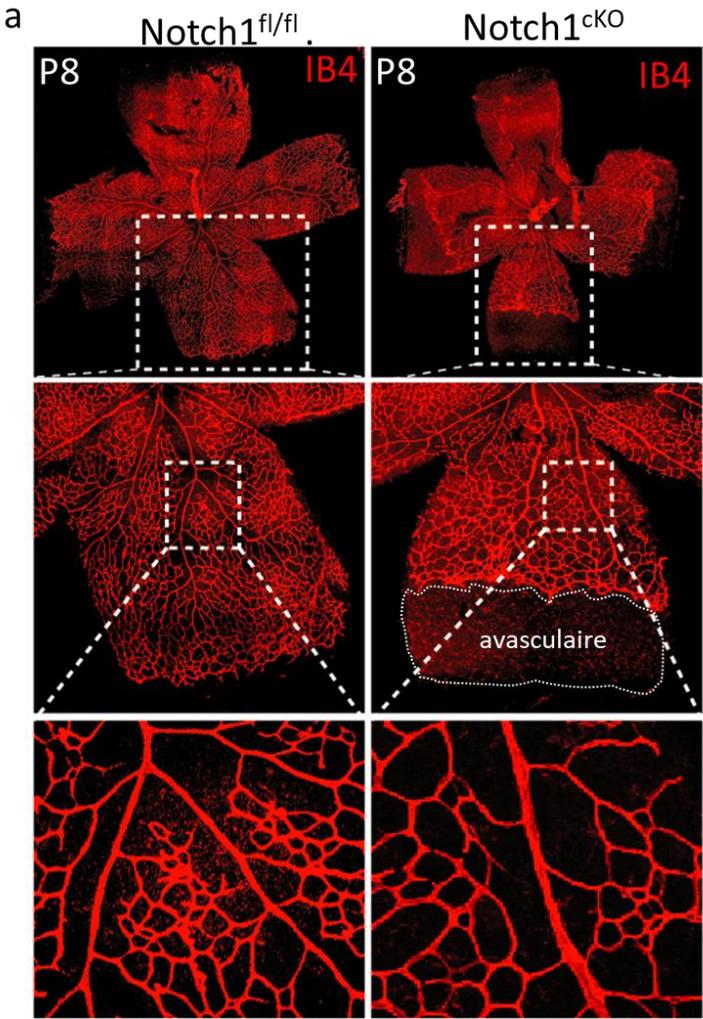
Figure 3.5 : Phénotype de persistance des vaisseaux hyaloïde à P8.

(a) Représentation des vaisseaux hyaloïdes (Notch1<sup>fl/fl</sup> vs Notch1<sup>ckO</sup>) de souris (P8) marqués par IB4 (1/200) et DAPI. Barre d'échelle = 100µm. (b) Évaluation quantitative de la densité vasculaire ((n=15); KO(n=18)), longueur des vaisseaux (Notch1<sup>fl/fl</sup> (n=15); Notch1<sup>ckO</sup> (n=18)), diamètre des vaisseaux (Notch1<sup>fl/fl</sup> (n=12); KO(n=15), des vaisseaux hyaloïdes P8- Notch1<sup>fl/fl</sup> vs P8. \*\*P≤0.01 \*\*\*P≤0.001 \*\*\*\*P≤0.0001 (T-test).

En second lieu, les phénotypes vasculaires des souris Notch1<sup>ckO</sup> ont été analysés. Chez les souris qui n'expriment plus le gène Notch1 (Notch1<sup>ckO</sup>), une importante densité des vaisseaux hyaloïdes a été constatée au lieu de la régression physiologique attendue (Figure 3.5a, b). L'absence de Notch1 a entravé la régression et a engendré une densité des vaisseaux hyaloïdes significativement élevée chez les Notch1<sup>ckO</sup> par rapport aux souris Notch1<sup>fl/fl</sup> (Figure 3.5b). La persistance des vaisseaux hyaloïdes est accompagnée d'un certain nombre d'anomalies vasculaires. Le diamètre des vaisseaux a augmenté chez les souris Notch1<sup>ckO</sup> (Figure 3.5b). Il a également été noté que les souris Notch1<sup>ckO</sup> montraient une longueur moyenne de vaisseaux hyaloïdes (Figure 3.5b). Globalement, ces résultats permettent d'affirmer que l'expression de Notch1 est requise pour la régression physiologique des vaisseaux sanguins hyaloïdes.

La délétion de Notch1 n'a pas exclusivement affecté les vaisseaux hyaloïdes. Dans ce contexte, plusieurs études ont déjà établi l'importance de Notch1 et de ses ligands dans le développement vasculaire de la rétine (Kume, 2009; Suchting *et al.*, 2007). Nous avons validé cet état de fait dans notre modèle de souris Notch1<sup>ckO</sup>. Un défaut de vascularisation rétinienne a été corroboré à P8 lorsque nous supprimons l'expression de Notch1 dans les cellules endothéliales chez ces souris; lequel défaut permet de voir un développement retardé du réseau vasculaire de la rétine (Figure 3.6a). La quantification de la surface vasculaire a montré que près de 50% de la surface rétinienne n'était pas vascularisée chez la souris Notch1<sup>ckO</sup> (Figures 3.6a, b). Certaines anomalies ont été

également relevées concernant la disposition vasculaire et la distance entre les vaisseaux, étant plus grandes chez les souris *Notch1<sup>ckO</sup>* (Figure 3.6c).



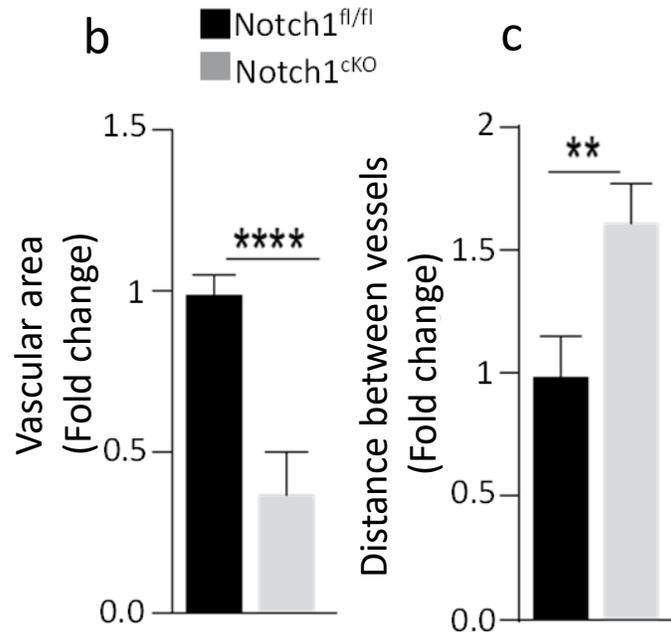
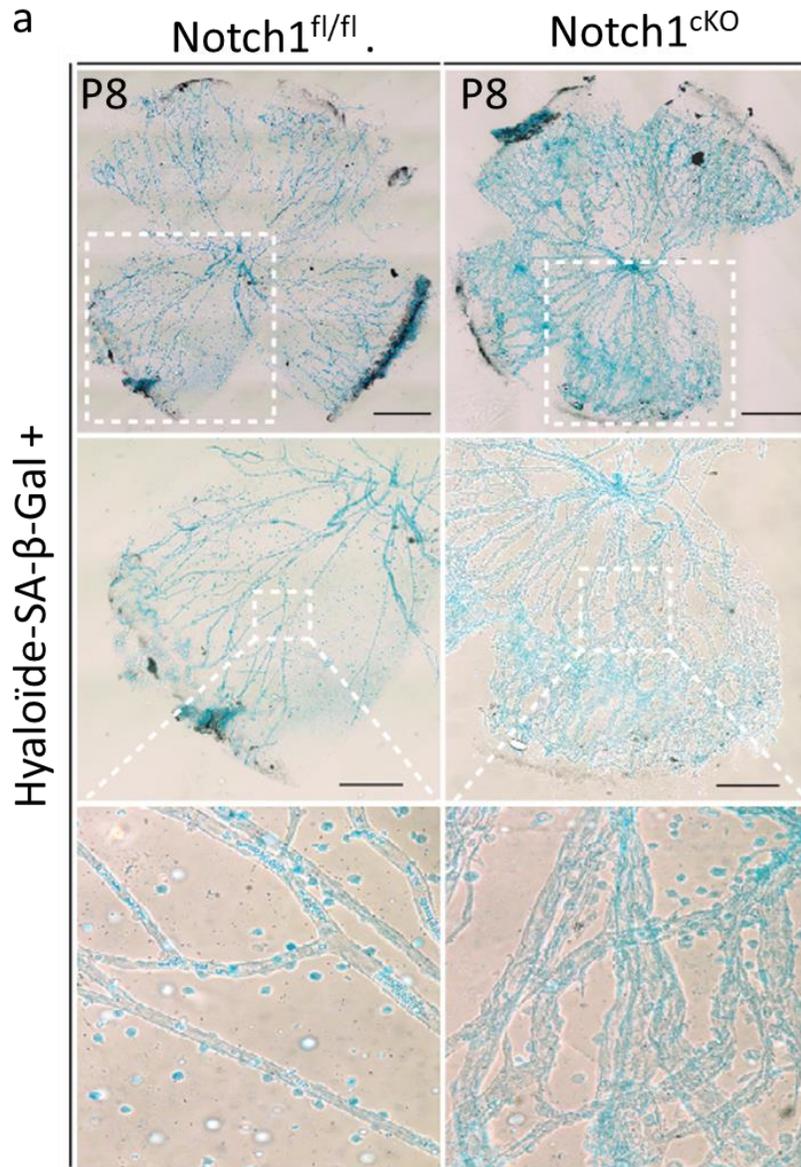


Figure 3.6 : Développement anormal des vaisseaux rétiniens à P8 chez la souris. (a). Marquage à l'isolectine (IB4) avec un défaut vasculaire observé dans la rétine Notch1<sup>cKO</sup>. Quantification de la surface vasculaire (b) et de la distance minimale entre les vaisseaux (c). \*\*P≤0.01 \*\*\*P≤0.001 \*\*\*\*P≤0.0001 (T-test).

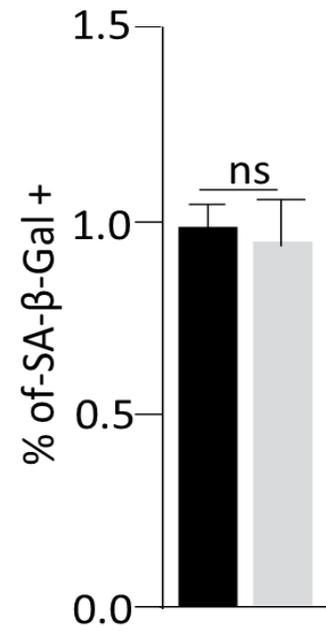
### 3.5 Délétion de Notch1 et expression de la sénescence dans les vaisseaux hyaloïdes

Puisque la délétion de Notch1 entraîne une persistance du réseau vasculaire hyaloïde, nous avons voulu déterminer si telle persistance était associée à la dérégulation des patrons de sénescence lors de la régression physiologique des vaisseaux hyaloïdes. Une coloration à la SA-β-Gal beaucoup plus dense a été constatée dans les vaisseaux hyaloïdes privés de Notch1, bien que cette augmentation était non significative dans les Notch1<sup>cKO</sup> (Figure 3.7a, b) ; les marqueurs de sénescence (p53, p16 et p21) étaient également régulés à la hausse dans les Notch1<sup>cKO</sup>. Cependant, cette augmentation n'est pas significative (Figures 3.7d, e, f). Parallèlement, nous avons observé une diminution drastique de l'expression de l'ARNm de Notch1 dans les vaisseaux hyaloïdes de souris présentant un déficit de Notch1 (Notch1<sup>cKO</sup>) (Figure 3.7c). Ces résultats laissent penser que Notch1 serait impliquée dans l'expression de la sénescence dans les vaisseaux hyaloïdes.

a



b



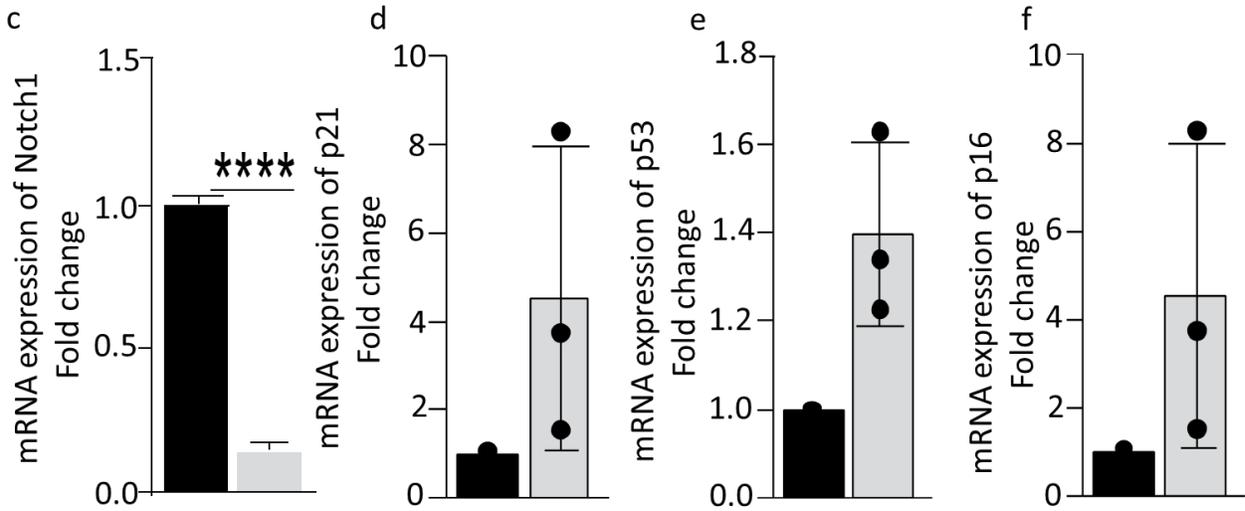


Figure 3.7 : Expression de Notch1 et des marqueurs de sénescence. (a) Représentation de vaisseaux hyaloïdes de P8 ( $Notch1^{fl/fl}$  vs  $Notch1^{cKO}$ ) marqués à la SA- $\beta$ -gal. (n=3) Barre d'échelle (500 $\mu$ m). Grossissements réalisés avec 20x. Barre d'échelle (200 $\mu$ m). (b) Évaluation quantitative de la SA- $\beta$ -gal sur 100 $\mu$ m de vaisseaux (n=3). (c) Expression génique de  $Notch1^{fl/fl}$  de  $Notch1^{cKO}$  et des marqueurs de sénescence (c, d, e et f) (n=3). \*\* $P \leq 0.01$  \*\*\* $P \leq 0.001$  \*\*\*\* $P \leq 0.0001$  (T-test).

### 3.6 Persistance, prolifération et apoptose

Afin de comprendre le mécanisme cellulaire à la base de la persistance des vaisseaux hyaloïdes, nous avons évalué le taux de prolifération à P8 en utilisant un analogue de la thymidine (EdU) capable de s'incorporer dans l'ADN nouvellement synthétisé lors de la mitose. Les souris ont reçu une injection intrapéritonéale de solution d'EdU six heures avant leur sacrifice à P8 (Figure 3.8a, b). Les pourcentages des cellules prolifératives qui ont incorporé l'EdU étaient significativement plus élevés dans les vaisseaux hyaloïdes  $Notch1^{cKO}$  par rapport au contrôle (Figure 3.8c). Ces résultats permettent de dire que la persistance des vaisseaux hyaloïdes s'accompagne d'une prolifération cellulaire accrue dans les vaisseaux hyaloïdes déficients de Notch1, suggérant que leur persistance pourrait être au moins partiellement induite par une prolifération plus marquée.

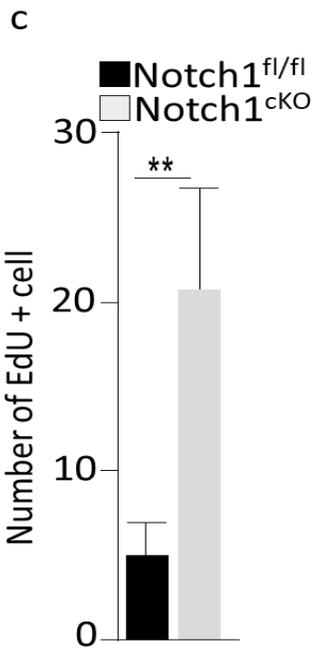
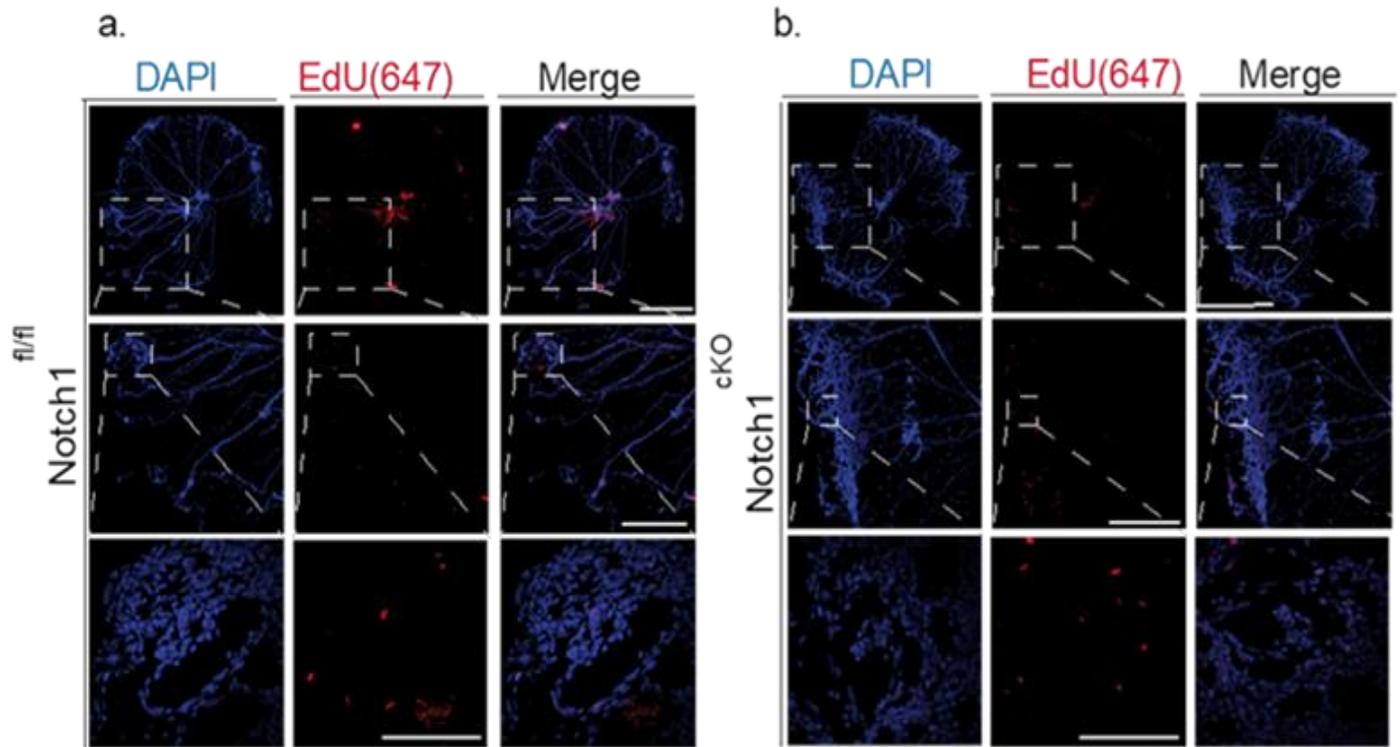
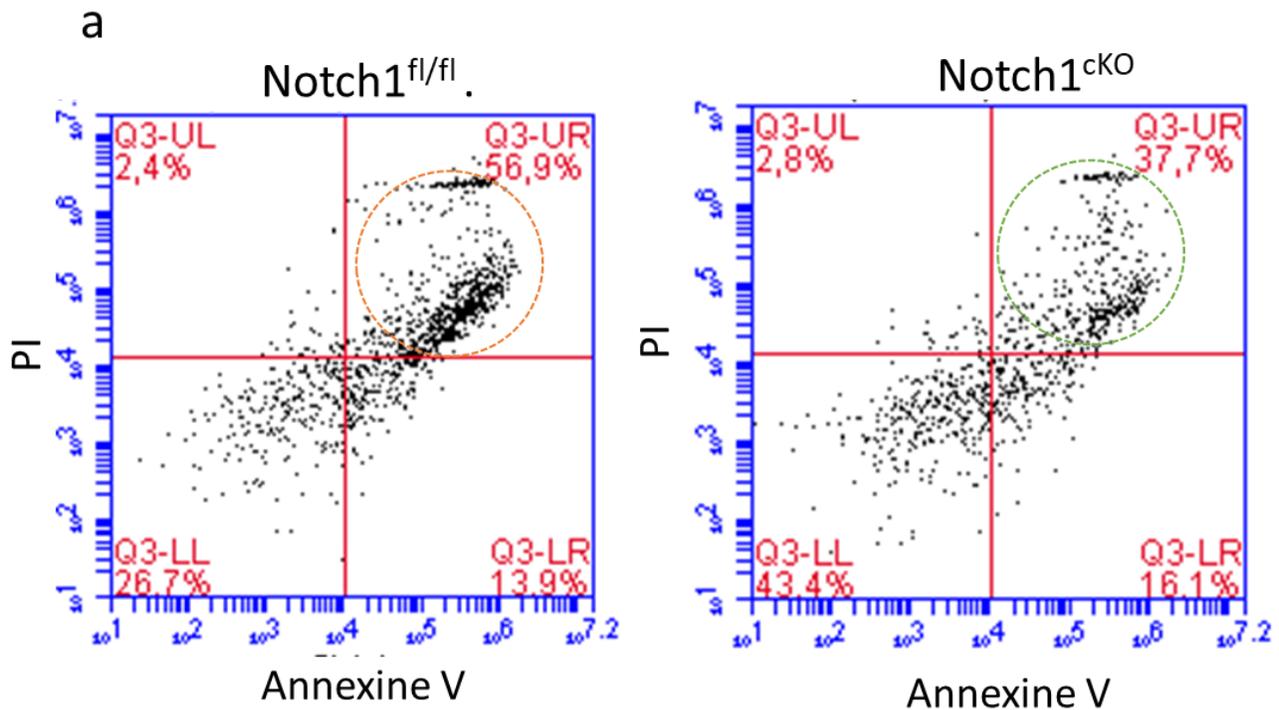


Figure 3.8 : Suivre de la prolifération cellulaire des cellules vasculaires hyaloïdes.

(a) Montage à plat de vaisseau hyaloïdes à P8-Notch1<sup>fl/fl</sup>. (b) Montage à plat de vaisseaux hyaloïdes à P8-Notch1<sup>cKO</sup>. Échelle 397um. (c) Quantification de cellules EdU positives. \*\*P≤0.01 \*\*\*P≤0.001 \*\*\*\*P≤0.0001 (T-test).

Il est connu, que les hyaloïdes régressent par apoptose et que les corps apoptotiques sont éliminés par les macrophages, il était très intéressant de comprendre comment se manifeste le processus d'apoptose chez les individus  $Notch1^{cKO}$  (Lobov *et al.*, 2005). Pour se faire, les cellules du réseau vasculaire hyaloïdes ont été prélevées et utilisées afin de réaliser un marquage à l'Annexine V. L'analyse par cytométrie en flux a permis de mettre en évidence un pourcentage significativement plus faible de cellules apoptotiques dans les vaisseaux hyaloïdes des souris  $Notch1^{cKO}$  (Figure 3.9a, b). Parallèlement, le pourcentage des cellules vivantes était quant à lui significativement plus élevé également dans les vaisseaux hyaloïdes de ces souris  $Notch1^{cKO}$  (Figure 3.9c). Ces résultats confirment une diminution de la mort cellulaire dans les vaisseaux hyaloïdes privés de Notch1 ce qui pourrait expliquer la persistance des vaisseaux hyaloïdes.



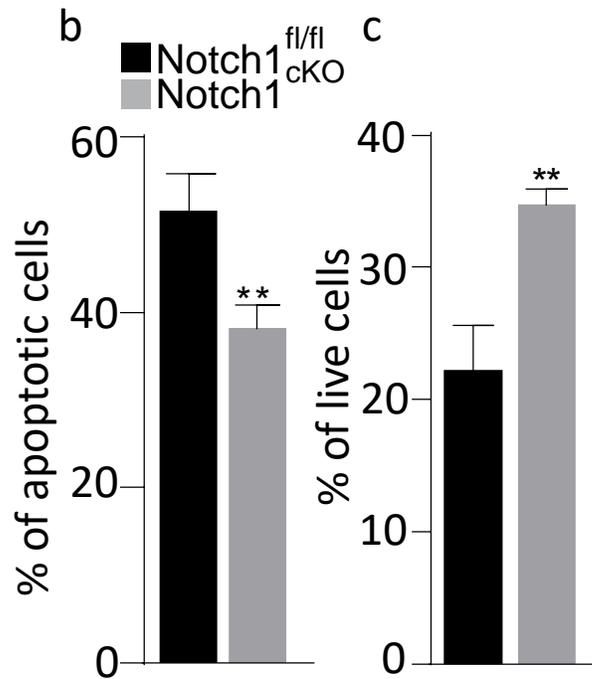


Figure 3.9 : Évaluation des cellules apoptotiques dans les vaisseaux hyaloïdes (P8) par cytométrie en flux. (a) Population de cellules apoptotiques (annexine V positive) dans les vaisseaux hyaloïdes Notch1<sup>fl/fl</sup> et Notch1<sup>cKO</sup> (b). (c) pourcentage des cellules vivantes dans les vaisseaux hyaloïdes Notch1<sup>fl/fl</sup> et Notch1<sup>cKO</sup> .

Afin d'analyser si la réduction de l'apoptose était aussi accompagnée par des changements dans les nombres de macrophages dans les hyaloïdes, un anticorps Iba1 (Ionized calcium-binding adapter molecule 1) a été utilisé afin de marquer spécifiquement les hyalocytes (microglie/macrophages) (Figure 3.10a). Les images obtenues révèlent plus de cellules marquées positivement à l'Iba1 dans les vaisseaux hyaloïdes Notch1<sup>cKO</sup> révélant un nombre total de hyalocytes significativement plus élevés dans les vaisseaux hyaloïdes Notch1<sup>cKO</sup> (Figure 3.10a, b). Il y a donc plus de macrophages dans les vaisseaux hyaloïdes privés de Notch1.

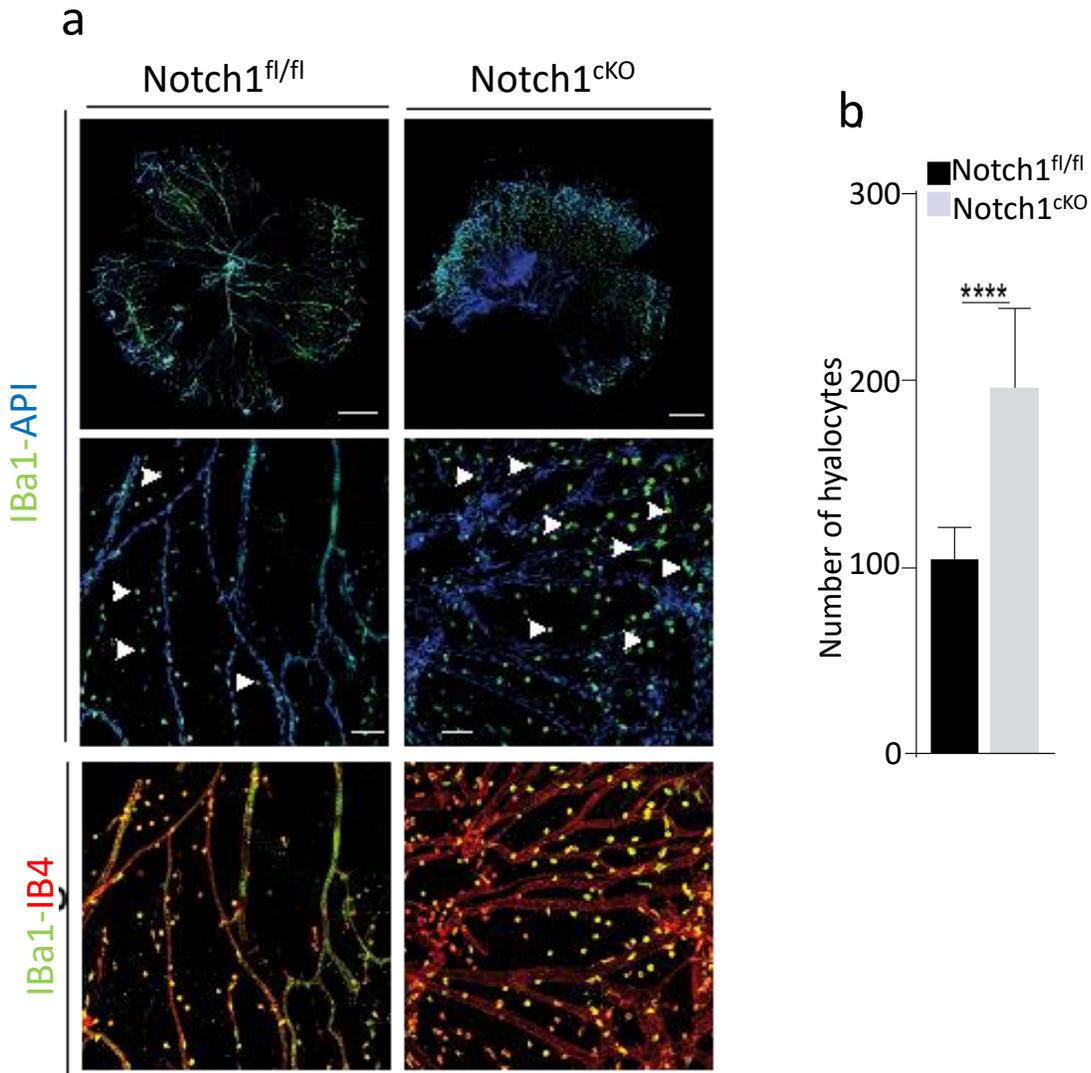


Figure 3.10 : Immunomarquage d 'Iba1.

(a) Images représentant des vaisseaux hyaloïdes P8 (Notch1<sup>fl/fl</sup> vs Notch1<sup>ckO</sup>) marqués au Iba1 (1/300) (n=3). Échelle 400µm. Grossissement zstack 20x (100µm). Les flèches pointent les hyalocytes. (b) Quantification de nombre total de hyalocytes dans chaque vaisseaux hyaloïde \*\*P≤0.01 \*\*\*P≤0.001 \*\*\*\*P≤0.0001 (T-test).

### 3.7 Notch1 et sénescence des cellules fibroblastiques embryonnaires

L'oxygène est en grande partie impliqué dans plusieurs pathologies de l'œil telles que la maladie du prématuré. Cette maladie est la principale cause évitable de cécité infantile (Daruich *et al.*, 2020). Elle survient chez les enfants nés avant terme, qui sont soumis à une oxygénothérapie mal contrôlée (Daruich *et al.*, 2020). Nous avons étudié le phénomène de la sénescence en présence de niveaux variables d'oxygène avec des cellules fibroblastes issus d'embryons murins. Les fibroblastes sont

des cellules dérivées des cellules souches mésenchymateuses dotées d'une capacité de reproduire en culture les étapes majeures du développement. Ils constituent un modèle de choix pour une étude *in vitro*. Pendant trois jours, les cultures primaires de fibroblastes ont été cultivées pendant trois jours en hyperoxie (75% O<sub>2</sub>) ou en hypoxie (3% O<sub>2</sub>) puis elles ont été retournées en normoxie (21%) pendant trois jours. Les résultats montrent une expression significativement élevée de la SA-β-galactoside dans les cellules soumises à l'hyperoxie avec environ 35% de cellules sénescents (Figures 3.11a, b). Le même résultat a été obtenu avec l'hypoxie (Figures supplémentaire 4a, b). Dans le même temps, les marqueurs de sénescence (pai-1 et p21) testés en immunobuvardage étaient tous régulés à la hausse (Figure 3.11c). En effet, il a été démontré que la signalisation pai-1 et celle de p21 sont régulées à la hausse au cours de la sénescence (Herbig *et al.*, 2004). Conformément à la littérature, la variation de l'oxygène induirait donc la sénescence dans les fibroblastes embryonnaires de souris (Even, 2018; Malaise *et al.*, 2021).

Nous avons aussi voulu savoir comment Notch1 est exprimée lors de la sénescence induite par variations d'oxygène. Pour se faire, nous avons réalisé un immunoblot avec de lysat cellulaire après traitement à l'hyperoxie et le lysat cellulaire qui a servi de contrôle a été cultivé dans une condition normale (21 % O<sub>2</sub>). Nos résultats montrent non seulement une forte expression de Notch1 en hyperoxie, mais aussi celle de sa forme active (NICD) par rapport aux conditions de normoxie (Figure 3.11c). Ce résultat suggère que la voie de Notch1 est impliquée dans l'expression de la sénescence.

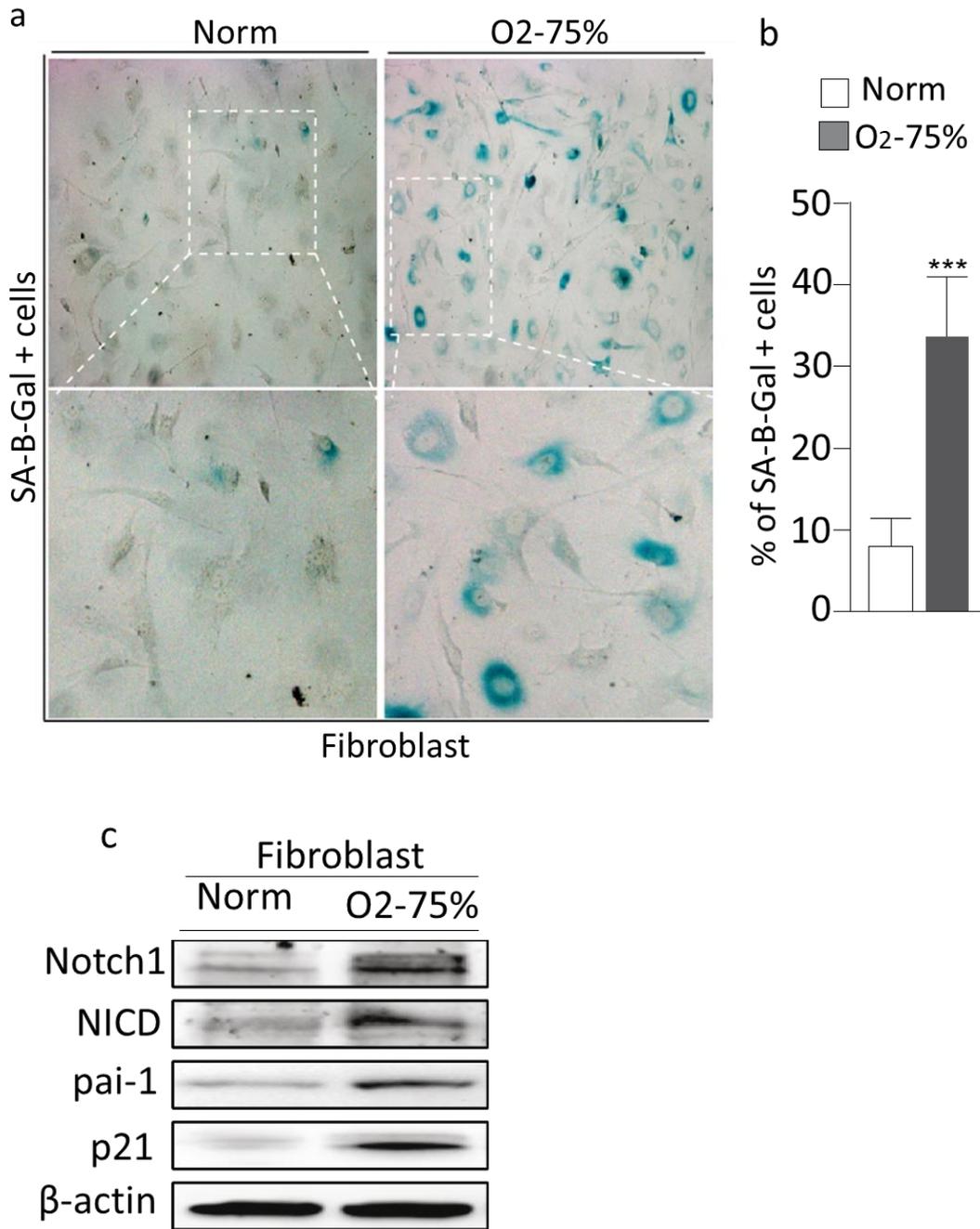


Figure 3.11 : Sénescence des cellules fibroblastes embryonnaires exposées à l'hyperoxie (75%O<sub>2</sub>). (a) Images représentatives de cellules (fibroblastes) marquées à la SA-β-gal (n=3). (b) Quantification des cellules SA-β gal positives. \*\*P≤0.01 \*\*\*P≤0.001 \*\*\*\*P≤0.0001 (T-test), ns P≤0,05. (c) Immunoblot montrant l'expression de Notch1, NICD et les marqueurs de sénescence (p3 et p21).

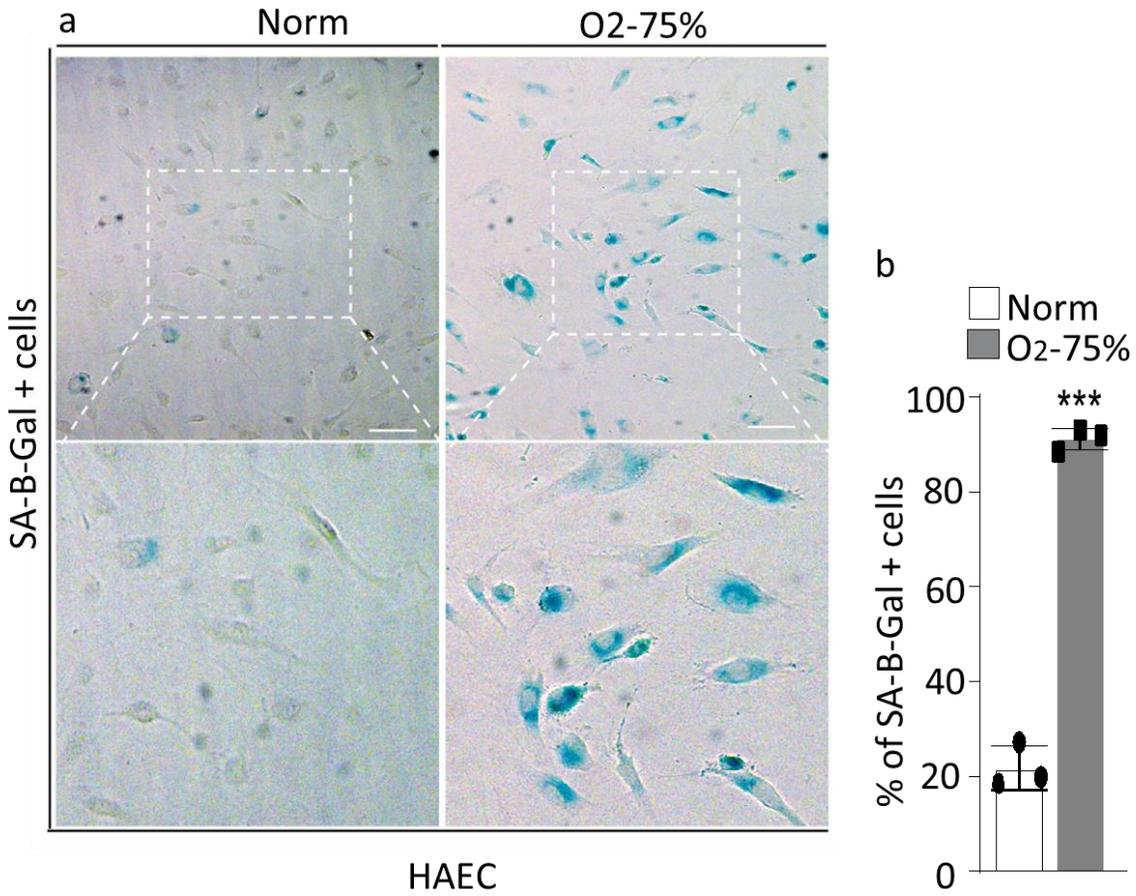
### 3.8 Notch1 et sénescence des cellules endothéliales humaines

La sénescence en réponse à l'hyperoxie étant établie dans les fibroblastes embryonnaires de souris, nous avons voulu comprendre comment s'exprime ce mécanisme dans des cellules endothéliales aortiques humaines (HAEC) et les cellules endothéliales de la veine ombilicale Human Umbilicale humaine (HUVEC). Il est connu que les cellules endothéliales représentant la grande majorité des cellules des vaisseaux hyaloïdes et sont impliquées dans le processus de formation des vaisseaux sanguins de l'œil chez la souris (Assaker, 2015 ; Blain *et al.*, 2017). Il convient de rappeler que les cellules HAEC sont de source artérielle et les cellules HUVEC veineuses. Alors ces cellules ont subi le même traitement en hyperoxie que celui précédemment décrit avec les fibroblastes. Les résultats obtenus du marquage avec SA- $\beta$ -Gal suggèrent l'induction de la sénescence lorsqu'elles sont exposées à une hyperoxie prononcée (Figures 3.12a, et 30a). Ce qui est très intéressant est que les cellules endothéliales exprimeraient donc différemment la sénescence lorsqu'elles sont soumises à l'hyperoxie. Les marqueurs de sénescence (p53, p16 et p21) testés par qPCR, sont significativement régulés à la hausse dans les cellules HAEC hormis p16 qui ne montre pas de changement significatif entre les deux conditions (Figures 3.12d, e, f, g). Dans les cellules HUVEC, l'expression de ces marqueurs a suivi montre la même tendance, mais de façon non significative (Figures 3.13d, e, f, g).

Les mêmes cellules (HAEC et HUVEC), ont ensuite été, soumises à l'hypoxie pendant trois jours. Les résultats du marquage à la SA- $\beta$ -Gal ont montré que les cellules d'origine artérielle et veineuses devenues sénescents (Figures supplémentaires 2a, 33a). La quantification de l'intensité de la SA- $\beta$ -Gal a révélé plus de cellules élevées en hypoxie comparativement à la normoxie (Figures supplémentaires 2b et 33b).

Plusieurs études suggèrent que le récepteur transmembranaire Notch1 est exprimé majoritairement par les cellules endothéliales des vaisseaux hyaloïdes et est impliqué dans le processus de formation des vaisseaux sanguins de l'œil chez la souris (Assaker, 2015 ; Blain *et al.*, 2017). Il était donc pertinent d'étudier l'expression génique de Notch1 lorsque les cellules étaient exposées à l'hyperoxie. Nos résultats montrent d'ARN que l'ARNm de Notch1 significativement régulé plus dans les HAEC et HUVEC en condition d'hyperoxie (Figure 3.12c et Figure 3.13c).

Tous ces résultats confirment que la variation d'oxygène induit la sénescence cellulaire dans les cellules d'origine humaine et que l'expression de Notch1 est régulée à la hausse suivant la sénescence.



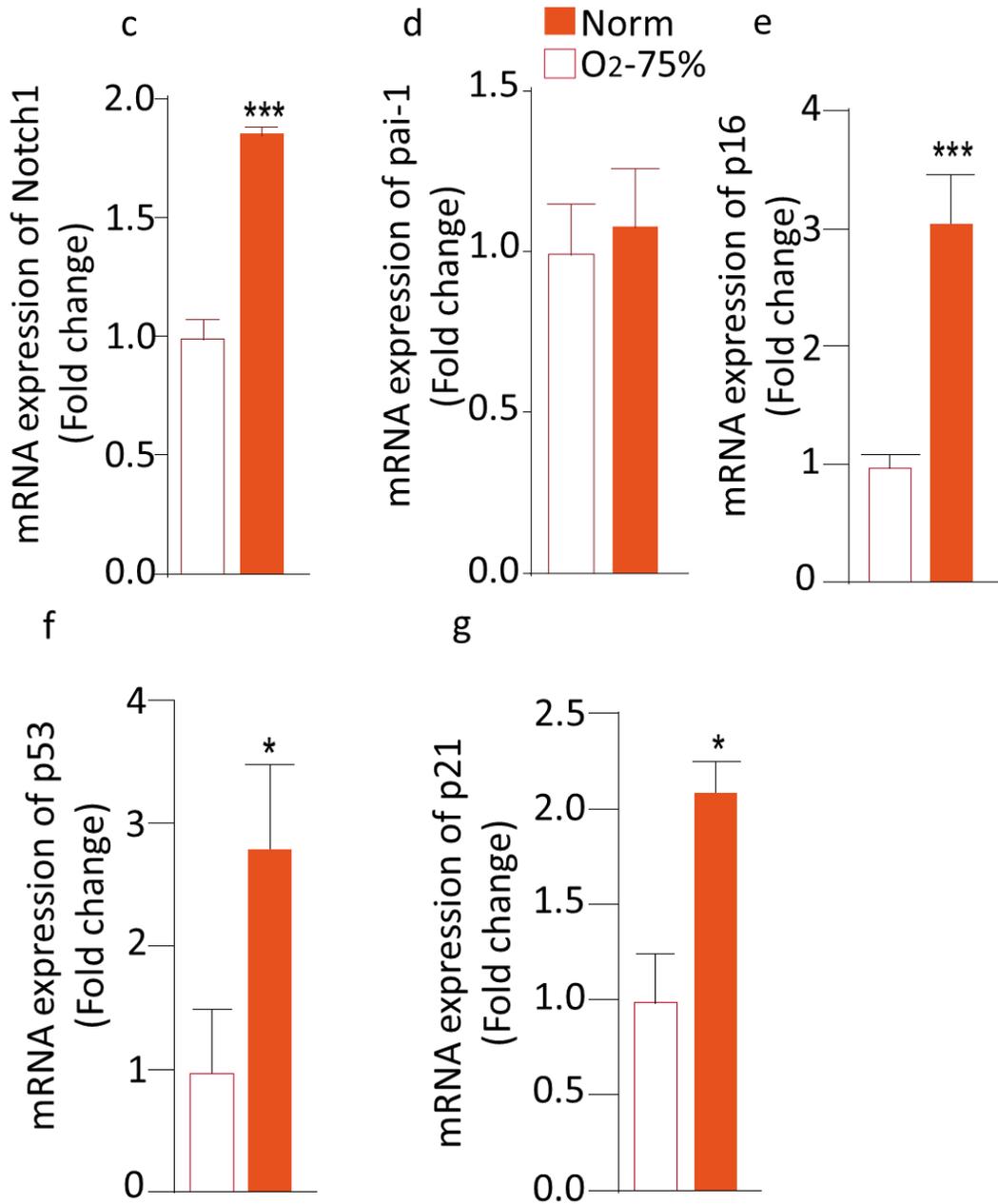
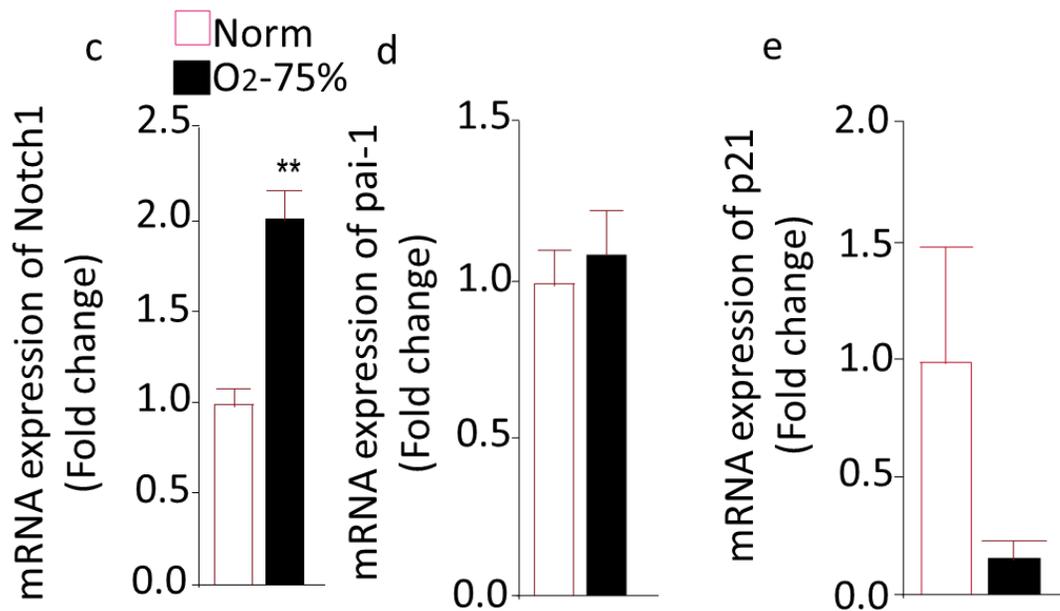
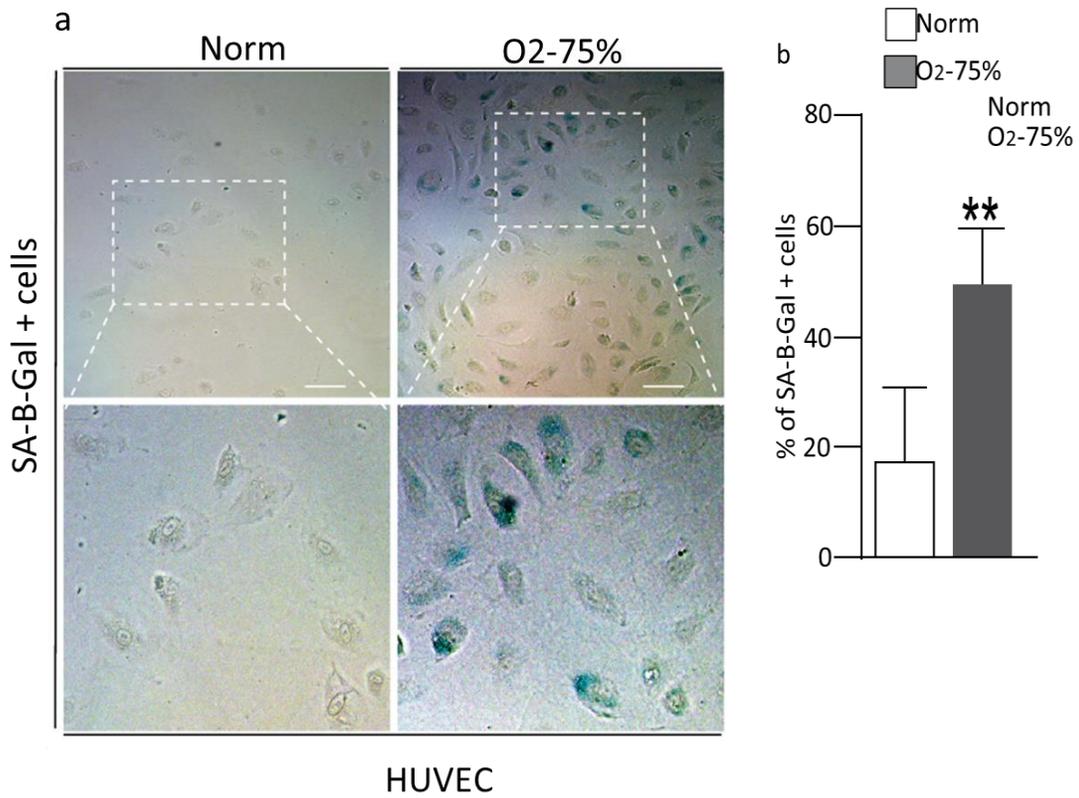


Figure 3.12 : Expression de la sénescence au niveau des cellules humaines d'origine artérielle (HAEC) exposées à l'hyperoxie (75 % O<sub>2</sub>).

(a). Marquage de la SA-B-Gal. (b) Quantification des cellules sénescents. Barre d'échelle :100µm. (n=3). qRT-PCR de Notch1 (c) et des marqueurs de sénescence ( d, e, f, g). \*\*P≤0.01 \*\*\*P≤0.001 \*\*\*\*P≤0.0001 (T-test).



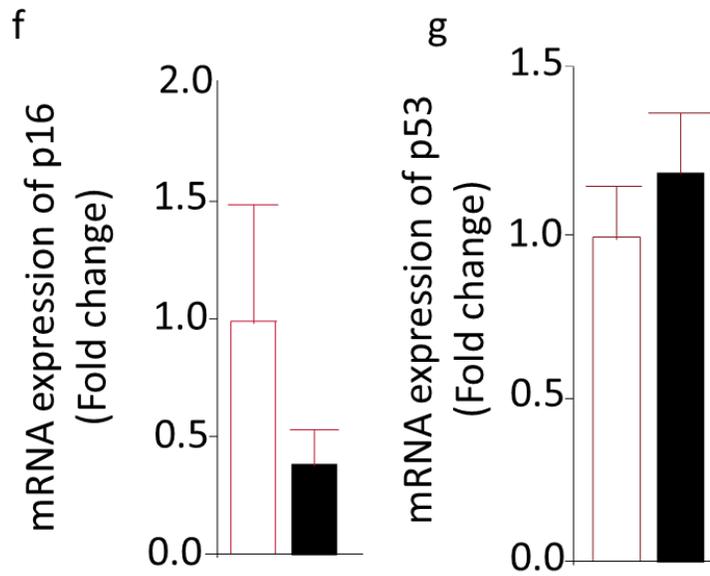


Figure 3.13 : Expression de la sénescence avec des cellules humaines d'origine artérielle (HUVEC) exposées à l'hyperoxie (75% O<sub>2</sub>). (a). Marquage de la SA-β-Gal. Barre d'échelle :100um. (n=4). (b). Quantification des cellules sénescentes. qRT-PCR de Notch1 (c) et des marqueurs de sénescence ( d, e, f, g).

## CHAPITRE 4

### Discussion

#### 4.1 Régression du réseau vasculaire des hyaloïdes chez la souris

Contrairement à l'homme chez lequel le système vasculaire hyaloïde est complètement régressé à la naissance, ce système vasculaire hyaloïde commence à régresser après la naissance chez la souris (Wang *et al.*, 2019). En effet, chez cette espèce, tandis que le réseau vasculaire de la rétine se développe après la naissance, le réseau vasculaire hyaloïde régresse au jour postnatal (P4) et disparaît complètement au jour postnatal (P21) (Yoshioka *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2019). Dans cette étude, nous avons étudié le processus de régression des vaisseaux hyaloïdes murins dans notre modèle de souris (C57BL/6J). Nous avons confirmé que les vaisseaux sanguins hyaloïdes régressent graduellement après la naissance en suivant les stades précédemment décrits selon la littérature (Wang *et al.*, 2019). Cette régression est caractérisée par une diminution moyenne de la densité vasculaire à P4 (35%) (Figures 3.1a, b). À P8, une régression drastique (65%) de cette densité vasculaire a été constatée (Figures 3.1a, b) qui corrobore des travaux antérieurs (Wang *et al.*, 2019). Cependant, un fait très intéressant a attiré notre attention. Il s'agit du diamètre des vaisseaux hyaloïdes (Figure 3.1a). En effet, nous avons observé que le réseau vasculaire hyaloïde présente des diamètres de plus gros calibre (environ le double) au stade de développement embryonnaire (E18.5) par rapport aux diamètres des vaisseaux postnataux (Figures 3.1a, c). Il est connu que les vaisseaux hyaloïdes régressent par le mécanisme d'apoptose. Cette régression est facilitée par les macrophages (péricytes) organisés autour des vaisseaux, qui permet l'élimination continue des corps apoptotiques sous le contrôle de la voie de signalisation Wnt (Lobov *et al.*, 2005). En effet, il a été démontré par plusieurs études que la voie Wnt est activée grâce à la sécrétion de l'angiopoïétine 2 (Ang2) par les péricytes entraînant la suppression de la voie AKT et en stimulant la production massive du récepteur Wnt7b par les macrophages (Lobov *et al.*, 2005; Peters *et al.*, 2004). Les voies Wnt et Ang2 contribuent à la stabilisation de la  $\beta$ -caténine grâce au corécepteur Lrp5 qui active les gènes cibles de Wnt favorisant l'arrêt du cycle cellulaire entre la phase G1 et la phase S (condition préalable à la mort cellulaire) (Rao *et al.*, 2007).

De récentes études ont montré l'existence de la sénescence prématurée très tôt au cours du développement embryonnaire dans certains organes chez la souris (Hosseinali-Sarjany, 2021 ;

Muñoz-Espín et al., 2013). De ce fait, nous nous sommes interrogés sur l'expression de la sénescence dans le réseau vasculaire des hyaloïdes aux différents stades de régression (E18.5, P0, P4, P8). Pour ce faire, les vaisseaux hyaloïdes de différents stades de développement ont été marqués à la SA- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) et l'intensité d'expression quantifiée (Figure 3.2a). Les résultats montrent une forte expression de la SA- $\beta$ -galactosidase associée aux vaisseaux hyaloïdes embryonnaires qui diminue dans les stades postnatals suivant la régression vasculaire jusqu'à P8 (Figure 3.2b). Cela laisse penser que la sénescence diminue au fur et à mesure que la densité vasculaire hyaloïde diminue, et donc évoluerait dans le même sens que la régression vasculaire (Figure 3.2b). De plus, l'expression des marqueurs clés de la sénescence augmente significativement dans l'ensemble (Pai1, p53, p21) au cours de la régression vasculaire des hyaloïdes (Figures 3.3c, d e, f, g). Ces résultats montrent, pour la première fois, l'expression de la sénescence cellulaire dans le réseau vasculaire hyaloïde (Figures 3.2a, b). Nous pensons que la sénescence cellulaire déclenche le processus de régression des vaisseaux sanguins hyaloïdes chez la souris. Les résultats de l'intensité de la SA- $\beta$ -Gal montrent que la sénescence diminue significativement suivant la régression vasculaire (Figure 3.2b). Ce résultat corrobore avec celui de l'expression génique des marqueurs de sénescence en qPCR (Figures 3.3c, d, e, f, g). Par manque de répétition (n), nous n'avons pas obtenu de résultats pour la quantification génique des marqueurs de sénescence à P8. Cependant, les résultats obtenus avec la q-PCR ont montré une expression significativement élevée (30 fois) de Pai1 aux stades postnatals comparativement aux stades embryonnaires (E18.5) (Figure 3.3g). L'ensemble de ses résultats révèle l'existence de la sénescence dans les vaisseaux hyaloïdes. Cette sénescence semble être impliquée dans le processus de développement vasculaire.

Après avoir montré l'existence de la sénescence dans les vaisseaux hyaloïdes, nous avons étudié la relation entre l'expression de Notch1 et le mécanisme de la sénescence spécifiquement puisqu'il est connu que l'activation de la signalisation Notch1 qui déclenche et soutient la sénescence cellulaire (Collado et Serrano, 2010; Herbig *et al.*, 2004; Hoare *et al.*, 2016). L'immunobuvardage réalisé avec des lysats de vaisseaux hyaloïdes a permis de voir que Notch1 et sa forme active (NICD) sont fortement exprimés aux stades de développement postnatal comparé au stade embryonnaire (Figure 3.3a). Ainsi, l'ensemble de ses résultats montre qu'il y a une forte expression de Notch1, mais également une expression de la sénescence cellulaire lors de la régression des vaisseaux

hyaloïdes chez la souris. Cependant, nos résultats n'établissent pas un lien direct entre la signalisation Notch1 et le mécanisme de la sénescence dans les vaisseaux hyaloïdes lors de leurs régressions. Alors nous nous sommes interrogés sur l'impacte de l'absence de Notch1 sur le processus de la régression vasculaire.

#### **4.2 L'inhibition de la voie de signalisation Notch1 entraîne une persistance anormale des vaisseaux hyaloïdes**

Nous avons démontré précédemment que l'expression et l'activité de Notch1 sont augmentées aux stades postnataux au cours du processus de la régression des vaisseaux sanguins hyaloïdes chez la souris (Figures 3.3a, b). Nous avons alors émis l'hypothèse selon laquelle Notch1 serait impliqué dans la régression vasculaire des hyaloïdes. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé une délétion de Notch1 spécifiquement dans les cellules endothéliales des vaisseaux hyaloïdes de la souris. La délétion de Notch1 a engendré une persistance du réseau vasculaire hyaloïde à P8 (Figure 3.5a) accompagné d'une augmentation (50%) de la densité vasculaire par rapport à celle durant la phase embryonnaire (Figure 3.5b). Ce résultat très intéressant suggère que Notch1 serait requis pour le bon développement du système vasculaire de l'œil puisque son absence entrave le processus de régression du réseau vasculaire hyaloïde (Figure 3.5a). Un résultat similaire a été reporté dans une étude menée par Lobov et son équipe en 2005 (Lobov *et al.*, 2005). Dans cette étude, ils obtiennent une persistance des vaisseaux hyaloïdes chez des souris ayant subi des mutations des récepteurs LRP5/6 connus pour leur implication dans la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Lobov *et al.*, 2005). Dans notre cas, la persistance des vaisseaux hyaloïdes a été causée par délétion de Notch1 spécifiquement dans les cellules endothéliales des vaisseaux hyaloïdes, ce qui laisse penser qu'il y a une communication entre la voie Notch1 et celle de Wnt/  $\beta$ -caténine au cours de la régression des vaisseaux hyaloïdes.

Nous avons aussi constaté que les vaisseaux hyaloïdes des souris dépourvues de Notch1 étaient non seulement plus longs que la normale, mais avec des diamètres en général plus gros (Figures 3.5a, b). L'augmentation (50%) de la longueur des vaisseaux en absence de Notch1 peut s'expliquer par le fait que celui-ci agit comme un inhibiteur du VEGF contrôlant ainsi l'angiogenèse (Suchting, Freitas, le Noble, *et al.*, 2007). Donc, la délétion de Notch1 supprime le rétrocontrôle négatif exercé par celui-ci afin de moduler l'angiogenèse. L'augmentation du diamètre des vaisseaux hyaloïdes Notch1<sup>CKO</sup> serait une conséquence directe de la délétion de

Notch1 pouvant s'expliquer par le fait que Notch1 joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie vasculaire. Une récente étude a rapporté que Notch1 contribue à l'augmentation de la perméabilité vasculaire au cours des rétinopathies diabétiques (Miloudi *et al.*, 2019). Notch1 induirait l'hyperplasie et la perméabilité vasculaire d'où son absence affecterait le diamètre des vaisseaux hyaloïdes. L'ensemble de ses résultats montre que la délétion de Notch1 entrave la régression développementale du système vasculaire fœtal.

### **4.3 Délétion de Notch1 entraîne un défaut de vascularisation de la rétine**

La délétion de Notch1 spécifiquement dans les cellules endothéliales du réseau vasculaire de la rétine engendre un défaut de vascularisation observable dès la première semaine postnatale (P8) (Figure 3.6a). Normalement, chez la souris, la couche superficielle est complètement formée le septième jour postnatal (Figure 1.6) et lorsqu'on supprime Notch1 spécifiquement au niveau des vaisseaux très tôt à la naissance, le développement vasculaire est affecté, entraînant un retard de la croissance du réseau vasculaire est constaté (Figure 3.6a). Il a été démontré que les récepteurs Notch4 et Notch1 agissent dans le processus de l'angiogenèse rétinienne plus précisément au cours de la croissance vasculaire et de la spécification artères/veines (Suchting *et al.*, 2007). En effet, au cours de la croissance vasculaire, la voie Notch1 interagit avec celle de la voie VEGF pour contrôler l'angiogenèse. Dans les cellules au front de la migration (tips cell), le VEGF induit l'expression de Dll4 qui à son tour, déclenche la signalisation Notch1 dans les cellules justes, en arrière (stalk cell), ce qui réduit la sensibilité de celles-ci au gradient de VEGF, entraînant ainsi la diminution de l'expression des récepteurs VEGFR2/VEGFR3 (Suchting *et al.*, 2007). À l'inverse, une forte expression de Jagged1 dans les cellules Stalk inhibe la signalisation de Notch1 médiée par Dll4, ce qui augmente l'expression du VEGF dans les cellules leader (tips cell) laquelle facilite le bourgeonnement des cellules (Suchting *et al.*, 2007). Nous pensons que dans ce présent résultat, la délétion de Notch1 a entraîné une rupture de la signalisation Notch1-Dll4 qui n'est plus à mesure de stimuler le VEGF, d'où le défaut de vascularisation caractérisé par moins de 45% de la surface rétinienne qui est vascularisée (Figures 3.6a, b). Un résultat similaire a été obtenu par Suchting *et al.* qui ont montré qu'une mutation partielle de Dll4 entraîne non seulement un arrêt du processus de vascularisation de la rétine, mais aussi une aberration de la disposition spatiale des vaisseaux (Suchting *et al.*, 2007). Contrairement à Suchting qui a montré une disposition serrée des vaisseaux sanguins rétiens, nous avons plutôt obtenu une disposition très espacée entre les

vaisseaux à la suite de la délétion de Notch1 (Figure 3.6c). Nous suggérons que la délétion de Notch1 affecterait les filopodes des cellules tips empêchant ces dernières de communiquer avec leurs homologues des cellules voisines. Tous ces résultats suggèrent que Notch1 est essentiel non, seulement dans l'angiogenèse rétinienne, mais aussi dans la régression développementale des vaisseaux fœtaux hyaloïdes.

#### **4.4 Délétion de Notch1 et expression de la sénescence dans les vaisseaux hyaloïdes**

Dans une récente étude, Hoare et son équipe ont rapporté que la voie Notch1 contribue à l'induction de la sénescence cellulaire dans les cellules fibroblastes embryonnaires de la peau (Hoare *et al.*, 2016). Dans cette étude, il a été démontré que l'expression de Notch1 augmente au cours d'une sénescence induite par un oncogène (Hoare *et al.*, 2016). Nous avons mis en évidence la sénescence dans les vaisseaux sanguins hyaloïdes aussi bien dans les souris exprimant le récepteur Notch1 (Notch1<sup>fl/fl</sup>) que celles chez lesquelles son expression a été supprimée (Notch1<sup>CKO</sup>) (Figure 3.7a) sans constater des différences majeures dans l'expression de la SA-β-Gal (Figure 3.7b). Nos résultats préliminaires montrent une diminution non significative de l'intensité de la coloration SA-β-Gal chez les tissus Notch1<sup>CKO</sup>. Cependant, en plus du faible nombre de reprises, nous n'avons pas pu développer une technique de quantification optimale prenant en compte la densité vasculaire et le marquage de la SA-β-Gal afin d'écarter l'influence de la densité vasculaire sur l'expression de la SA-β-Gal. Afin de palier à cette difficulté, il est envisagé de préciser l'identité des cellules qui expriment la sénescence à travers un marquage combiné de SA-β-Gal et des anticorps NG2, IBa1, ERG1 marquant les péricytes et les macrophages respectivement. Cela permettra, non seulement de quantifier l'intensité de la SA-β-Gal de façon spécifique (ciblée) mais aussi de tirer des informations sur le type de cellule qui exprime potentiellement la sénescence au niveau des vaisseaux hyaloïdes. Par ailleurs, les vaisseaux sanguins hyaloïdes Notch1 déficients semblent révéler une expression génique accrue de p16, p21 et p53 qui sont des marqueurs clés de la sénescence (Figures 3.7c, d, e, f). Ce résultat semble montrer que Notch1 régulerait négativement l'expression de la sénescence au cours de la régression de vaisseaux hyaloïdes. Il serait intéressant dans un premier temps, d'augmenter le nombre de réplique de l'expression génique des marqueurs clés de la sénescence et dans un deuxième temps, développer un outil de quantification assez performant de l'expression de la SA-β-Gal dans les vaisseaux hyaloïdes. Il sera également pertinent

de mieux investiguer la signalisation de Notch1 en étudiant la signalisation en aval et amont de Notch1 en étudiant l'expression de ses ligands cibles (Dll4, Jagged1) par immunobuvardage et q-PCR.

#### **4.5 Persistance, prolifération et apoptose**

Les vaisseaux sanguins hyaloïdes des souris ayant Notch1 délété ont montré un nombre significativement plus élevé (22%) de cellules EdU positives comparativement aux souris contrôles (7%). (Figures 3.8a, b, c). Ce résultat suggère qu'il y aurait plus de prolifération cellulaire dans les vaisseaux hyaloïdes n'exprimant plus Notch1, ce qui laisse penser que la prolifération serait un des éléments responsables de la persistance de vaisseaux observée en absence de Notch1. Selon la littérature, la signalisation Notch1-Myc contrôle la croissance et la prolifération cellulaire dans le cas d'une leucémie lymphoblastique aiguë (T-ALL) (Hoare *et al.*, 2016). En favorisant la prolifération cellulaire, son absence entraînerait une persistance anormale des vaisseaux hyaloïdes. Lorsqu'on extrapole ce phénomène chez l'humain, cela expliquerait la persistance des vaisseaux fœtaux responsables de la perte de vue chez certains individus qui souffrent d'une persistance des vaisseaux sanguins fœtaux.

Face à un tel résultat, il était très intéressant de comprendre comment se comporte le processus d'apoptose en absence de Notch1 puisque selon la littérature, les vaisseaux hyaloïdes régressent à la suite à l'induction par apoptose (Nayak *et al.*, 2018). L'analyse par cytométrie en flux de cellules dissociées des vaisseaux hyaloïdes marqués à l'annexine V a permis d'apprécier un pourcentage (37,7%) de cellules apoptotiques significativement bas chez les souris Notch1<sup>ckO</sup> comparativement au souris Notch1<sup>fl/fl</sup> (Figures 3.9a, b). Il y a donc peu d'apoptose, mais plus de cellules vivantes dans celles-ci (Figure 3.9c). Une récente étude suggère que la régression des vaisseaux hyaloïdes est initiée par la suppression de la signalisation via VEGF et aussi par la régulation à la hausse de l'expression de Wntb7 dans les macrophages, médiés par une expression de l'angiopoitrine2 (Ang2) exprimée par les péricytes (Nayak *et al.*, 2018). En supprimant l'activité d'Atomistix ToolKit (AKT), pour favoriser la mort cellulaire, Ang2 active également la  $\beta$ -caténine par la voie Myc afin de favoriser la mort cellulaire (Nayak *et al.*, 2018). Par ailleurs, une autre étude explique qu'une forte activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine entraîne l'augmentation d'expression de Dll4 qui augmente la signalisation par Notch1 et qui exercerait un rétrocontrôle négatif sur le VEGF (Reis & Liebner, 2013). Cette voie étant inhibée par délétion de Notch1, une forte expression du VEGF

est attendue, qui pourrait expliquer la densité vasculaire observée chez les souris Notch1<sup>ckO</sup> à l'origine de certaines vitréorétinopathies.

Afin d'élucider si la baisse de l'apoptose était associée à une réduction du nombre de macrophages, nous avons réalisé un marquage des hyalocytes (microglies/macrophages) par Iba1 qui a plutôt montré une augmentation significative de leur nombre chez les souris Notch1<sup>ckO</sup> (Figures 3.10a, b). Des études antérieures ont montré qu'au cours de l'angiogenèse rétinienne, les macrophages sont étroitement associés à la germination des cellules endothéliales et facilitent l'anastomose en formant des ponts entre les germes voisins (Checchin *et al.*, 2006 ; Fantin *et al.*, 2010). Nous suggérons que le nombre élevé de macrophages favoriserait l'élimination des cellules endothéliales apoptotiques facilitant la régression vasculaire. Il a aussi été rapporté que la signalisation Notch1 est importante pour le recrutement et la localisation des macrophages dans la rétine en développement (Outtz *et al.*, 2011). Cependant, dans la régression des vaisseaux hyaloïdes, le lien de la signalisation Notch1 et les macrophages n'est pas élucidé. Nous émettons l'hypothèse que ces macrophages jouent un rôle important dans la sénescence en relation avec Notch1. Il serait donc intéressant d'évaluer le rôle des macrophages en réalisant un co-marquage (Iba1) et la SA-β-Gal dans les vaisseaux hyaloïdes exprimant Notch1 et dans ceux qui n'en expriment pas; afin d'évaluer leur rôle précis des macrophages dans la régression vasculaire et la sénescence. Cela nous permettra de déterminer l'intensité de la SA-β des macrophages dans les vaisseaux hyaloïdes Notch1<sup>ckO</sup> comparativement au vaisseaux hyaloïdes Notch1<sup>fl/fl</sup>.

#### **4.6 Notch1 et expression de la sénescence cellulaire induite par variation d'oxygène**

La plupart des rétinopathies rares affectent les enfants nés prématurément où l'oxygène est très souvent cité comme facteur aggravant dans ces rétinopathies, car le traitement prolongé d'oxygène augmente le risque de rétinopathie. Afin d'étudier le rôle possible de la variation d'oxygène sur l'induction de la sénescence, nous avons soumis des cellules fibroblastiques embryonnaires à une hyperoxie (75% O<sub>2</sub>). Ce stress est censé causer des dommages importants à l'ADN tout comme l'hypoxie (3% O<sub>2</sub>) (Figures supplémentaires 1a, 2a). Le dommage à l'ADN a été mis en évidence par le marquage phosphorylation de l'histone (HA2X) qui est un biomarqueur pour les cassures double brin de l'ADN (Figure supplémentaire 1a). Nos résultats montrent qu'il y a plus de dommage à l'ADN dans les cellules exposées à l'hypoxie par rapport à la normoxie (Figure supplémentaire 1b). Par la suite, nous avons réalisé la SA-β-Gal sur des fibroblastes exposés à

l'hypoxie qui ont montré une expression de la sénescence cellulaire significativement plus élevée (30%) comparativement à la normoxie (Figures supplémentaires 4a, b). La même expérience de l'hypoxie 3%O<sub>2</sub> a été réalisée sur les HAEC et HUVEC qui ont donné également plus de sénescence dans les cellules hypoxiques (Figures supplémentaires 3a et 4a). Alors l'hyperoxie causerait également des dommages à l'ADN; ce qui pourrait expliquer la sénescence par la SA-β-Gal (Figures 3.12a et 30a). Cependant, il serait très pertinent de le confirmer à travers un marquage au IBa1 sur des cellules exposées à l'hyperoxie.

D'ailleurs il est connu qu'une hyperoxie (75% O<sub>2</sub>) est susceptible d'induire le mécanisme de sénescence cellulaire dans les fibroblastes diploïdes humains (HDF) normaux (Vaziri *et al.*, 1997). L'hyperoxie a entraîné de la sénescence à plus de 75% dans les cellules fibroblastiques (Figure 3.11a) comparativement aux cellules restées en normoxie (Figures 3.11a, b). L'expression des marqueurs de sénescence (pai-1 et p21) est également régulée à la hausse dans les conditions de stress induit par l'hyperoxie (Figure 3.11c) résultats qui concordent avec ceux de la littérature (Parikh *et al.*, 2019; Vaziri *et al.*, 1997). Ce qui est très intéressant est la régulation à la hausse de Notch1 et de sa forme clivée (NICD) en immunobuvardage dans les mêmes conditions hyperoxiques chez les fibroblastes (Figure 3.11c). Puisque l'expression de Notch1 semble induire la sénescence, nous pensons que son activité serait nécessaire pour l'expression de la sénescence comme le suggère la littérature (Teo *et al.*, 2019).

En outre, la variation d'oxygène semble être un élément important dans l'expression de Notch1. Il est important de rappeler que l'expression de Notch1 était également régulée à la hausse dans les vaisseaux hyaloïdes postnataux (Figure 3.3a). Alors que ces stades (P0, P4, P8) correspondent au moment où les yeux sont exposés à un taux d'oxygène (21%) supérieur à celui observé au stade embryonnaire (E18.5). La variation de l'oxygène induit la sénescence cellulaire (Figures 3.11a, 29a, 30a). Il était prévu dans ce projet d'étudier l'expression de Notch1 et de la sénescence cellulaire avec les fibroblastes dépourvues de Notch1 afin d'explicitier la relation entre Notch1 et la sénescence. Il serait donc intéressant de compléter cette expérience en réalisant une délétion de Notch1 dans des fibroblastes puis induire l'hyperoxie. Par la suite l'immunobuvardage et la qPT-PCR de lysat de ces cellules pourront fournir des informations sur l'expression de Notch1 et des marqueurs de la sénescence.

Par la suite, nous avons utilisé des cellules d'origine artérielle (HAEC) ou veineuse (HUVEC). Ces deux types de cellules endothéliales entrent en sénescence cellulaire à la suite des stress hyperoxique (figures 3.12a, 30a). Cette sénescence peut s'expliquer par le fait que l'hyperoxie est considérée comme un stress susceptible de créer un dommage à l'ADN lequel peut déclencher le processus de sénescence conformément au mécanisme moléculaire menant à un état sénescence de la cellule comme démontré en 1.3.1. Il est connu que lorsque les cellules sont soumises à un stress, elles rentrent en sénescence afin d'y résister. Elles ne meurent pas, mais elles arrêtent de se diviser tout en sécrétant un ensemble de molécules qui facilitent leur survie. Ces résultats confirment que les cellules endothéliales deviennent sénescences lorsqu'elles sont soumises à des variations d'oxygène. Cependant, la sénescence s'est montrée plus prononcée dans les cellules HAEC avec 90% d'entre elles, SA- $\beta$ -Gal positives contre seulement 20% des cellules en normoxie, tandis qu'au niveau des HUVEC, 55% des cellules étaient SA- $\beta$ -Gal positives contre environ 18% en normoxie (Figures 3.12b, 30b). L'expression génique des marqueurs clés (p53, p21 et p16) de la sénescence est significativement régulée à la hausse dans les cellules HAEC exposées à l'hyperoxie (Figures 3.12c, d, e, f, g). Ces résultats confirment que les cellules HAEC entrent dans un état sénescence lorsqu'elles sont stressées. Cependant, l'expression génique des marqueurs clés de la sénescence (p53, p16, p21 et Pai1) est mitigée dans l'ensemble lorsqu'on soumet les cellules HUVEC à l'hyperoxie (Figures 3.13c, d, e, f, g). Comme attendu, Notch1 est régulé significativement à la hausse. Notch1 se comporte comme un marqueur de sénescence au cours de la sénescence cellulaire induite par l'oxygène. Nos résultats ont montré que ces deux types cellulaires (HAEC et HUVEC) expriment la sénescence lorsqu'elles sont stimulées à une variation d'oxygène.

Des études récentes ont démontré que Notch1 contrôle de manière autonome le SASP considéré comme la principale source d'activité de la sénescence non autonome (Hoare et Narita, 2017). Alors les résultats de l'expression génique de Notch1 dans des extraits cellulaires HAEC et HUVEC traduisent une hausse significative de l'ARNm de Notch1 lorsque celles-ci sont exposées à l'hyperoxie (Figures 3.12c, 30c). Ces résultats soutiennent que la signalisation Notch1 modulerait la sénescence dans les cellules endothéliales humaines d'origine artérielle. L'augmentation de la sénescence par Notch1 dans les HAEC peut être justifiée par le fait que Notch1 est un biomarqueur d'artère (Sciacca *et al.*, 2013). Ceci expliquerait donc cette différence de la sénescence dans les HAEC et les HUVEC. Il serait très intéressant de réaliser une délétion conditionnelle de Notch1

dans les cellules humaines afin de déterminer si Notch1 module vraiment la sénescence cellulaire dépendamment du type de cellules endothéliales.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La régression développementale des vaisseaux hyaloïdes au cours de l'embryogenèse de l'œil constitue une étape cruciale, si bien qu'une entrave à cette régression engendre des maladies rares de la vision parmi lesquelles la persistance vasculaire des vaisseaux fœtaux. Le récepteur transmembranaire Notch1 est un régulateur essentiel de l'angiogenèse, de la différenciation et de l'intégrité vasculaire.

Pour la première fois, ce projet a permis d'identifier l'expression de Notch1 dès les premiers stades de développement embryonnaire des vaisseaux sanguins hyaloïdes chez la souris. L'ARNm et la protéine Notch1 sont très exprimés au niveau des vaisseaux hyaloïdes avec une augmentation remarquable dans les stades postnatals (P0, P4 et P8) comparativement au stade embryonnaire (E18.5). La quantification du domaine intracellulaire de Notch1 (NICD) qui est sa forme active a également été régulée à la hausse dans les lysats de vaisseaux hyaloïdes aux stades postnatals chez la souris.

Des données de notre laboratoire en cours de publication ont reporté que l'induction de la sénescence cellulaire au cours du développement physiologique des vaisseaux hyaloïdes. Le marquage de la SA- $\beta$ -Gal en plus de la quantification de l'expression génique des marqueurs clés de la sénescence (Pai1, p53, p21, p16) et de Notch1 révèle l'induction de la sénescence. Une délétion conditionnelle de Notch1 spécifiquement dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins hyaloïdes de l'œil entraîne une persistance de ceux-ci au lieu de la régression physiologique attendue.

Ces résultats montrent que l'expression de Notch1 est indispensable pour une régression physiologique des vaisseaux sanguins hyaloïdes au cours de la formation de l'œil de la souris. La persistance observée chez les souris dépourvues de l'expression de Notch1 dans les vaisseaux hyaloïdes impliquerait une augmentation de la prolifération cellulaire. Cependant, il est très important d'élaborer et optimiser un protocole de quantification de la SA- $\beta$ -Gal afin de pouvoir mesurer l'expression du marquage de celle-ci spécifiquement au niveau des cellules exprimant effectivement la sénescence. Des données préliminaires *in vitro* de cultures endothéliales humaines d'origine artérielles (HAEC), veineuse (HUVEC) ainsi que des fibroblastes embryonnaires de

souris soumises à un stress d'oxygène (hypoxie 3%) et (hyperoxie 75%) montrent une forte expression génique de Notch1 comparativement aux conditions de contrôle (normoxie). Cette augmentation de l'expression de Notch1 s'accompagne par une induction de la sénescence. Notch1 semble jouer un rôle important en réponse à des variations d'oxygène dans l'induction de la sénescence. Des données préliminaires montrent que l'ablation de Notch1 dans des fibroblastes embryonnaires entraîne non seulement une baisse de l'expression de Notch1, mais aussi une réduction de la SA- $\beta$ -Gal. Notch1 modulerait donc la sénescence *in vitro*.

En perspective, il serait donc très intéressant de mieux élucider la relation entre la signalisation Notch1 et l'expression de la sénescence dans le processus de la régression des vaisseaux hyaloïdes en étudiant simultanément l'expression des gènes cibles de Notch1 (HES1, HEY1)) et les marqueurs clé de la sénescence chez des souris Notch1<sup>CKO</sup> comparativement au souris Notch1fl/fl.

Il serait également très important d'identifier les types cellulaires dans lesquelles la sénescence est induite dans les vaisseaux hyaloïdes aux différents stades du développement (embryonnaire et postnataux) en réalisant un co-marquage de la SA- $\beta$ -GAL avec différents anticorps spécifiques des différents types cellulaires (IBa1, NG2, Nr2f2).

Dans le but de mieux comprendre le rôle de Notch1 dans les rétinopathies, il est aussi envisagé de déterminer l'expression de Notch1 et son activité dans un modèle de souris exposé à une forte concentration d'oxygène (75%) rétinopathie induite par oxygène (OIR), ce qui crée des zones avasculaires dans la rétine similaire à celle observée dans le cas de la rétinopathie diabétique et la rétinopathie du prématuré. Cela permettra d'élucider le mécanisme cellulaire et moléculaire de ces rétinopathies et constituerait une cible thérapeutique.

ANNEXE A  
Dommage à l'ADN

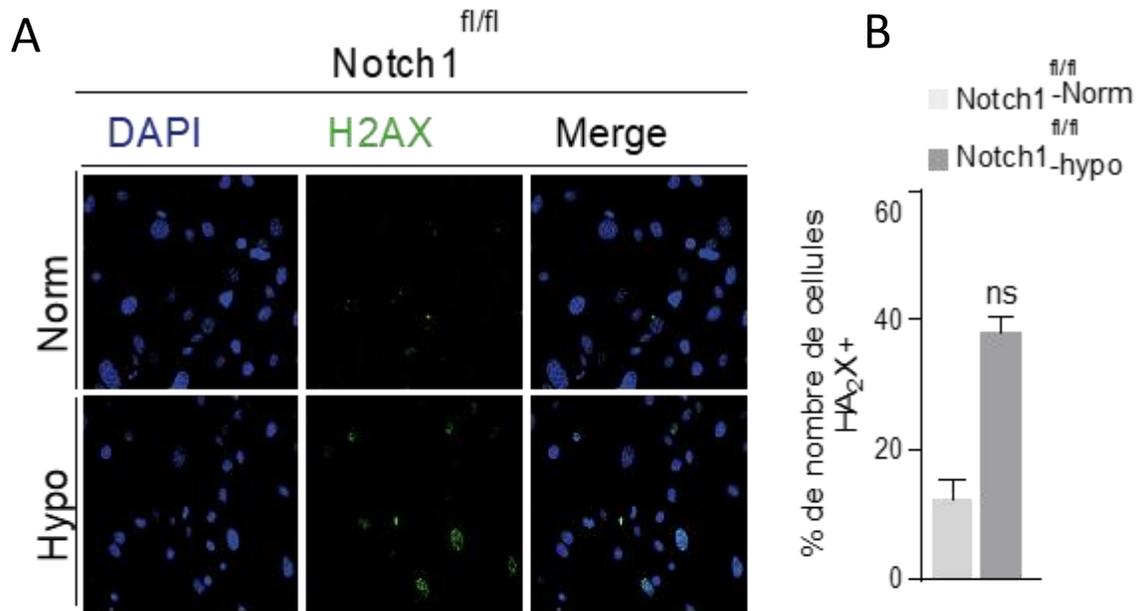


Figure supplémentaire 4.1 : Immunomarquage anti- $\gamma$ -H2AX.  
(A). Mise en évidence du dommage à l'ADN de fibroblastes en hypoxie et en normoxie. (B). Quantification de nombre de cellules  $\gamma$ -H2AX positives.

## ANNEXE B

### Marquage SA- $\beta$ -Galactosidase HAEC hypoxie

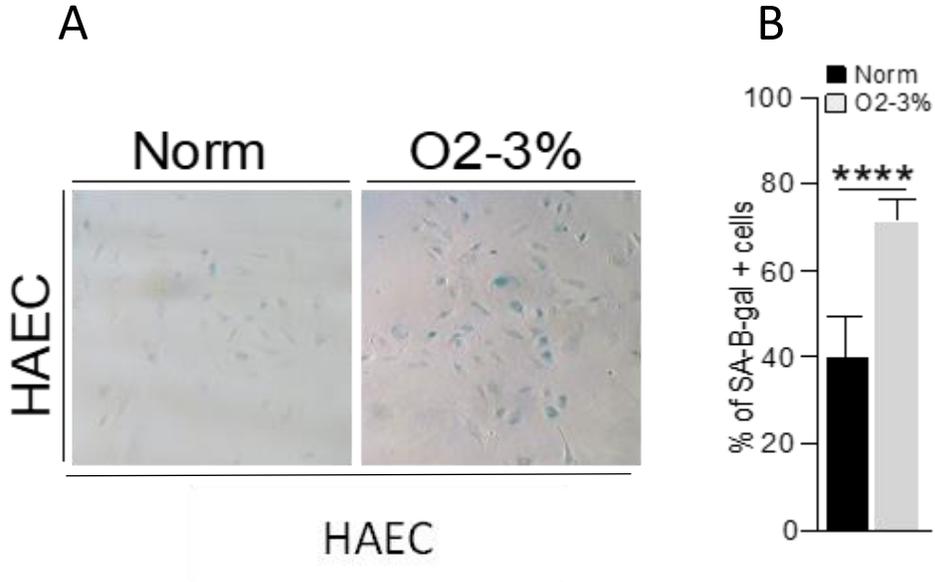


Figure supplémentaire 4.2 : Expression de la sénescence avec des cellules humaines d'origine artérielle (HAEC) exposées à l'hypoxie (3% O<sub>2</sub>).

(A). Marquage de la SA-B-Gal, et quantification des cellules sénescents (B). Barre d'échelle :100um. (n=3). \*\*P≤0.01 \*\*\*P≤0.001 \*\*\*\*P≤0.0001 (T-test), ns P≤0,05.

## ANNEXE C

### Marquage SA- $\beta$ -Galactosidase HUVEC hypoxie

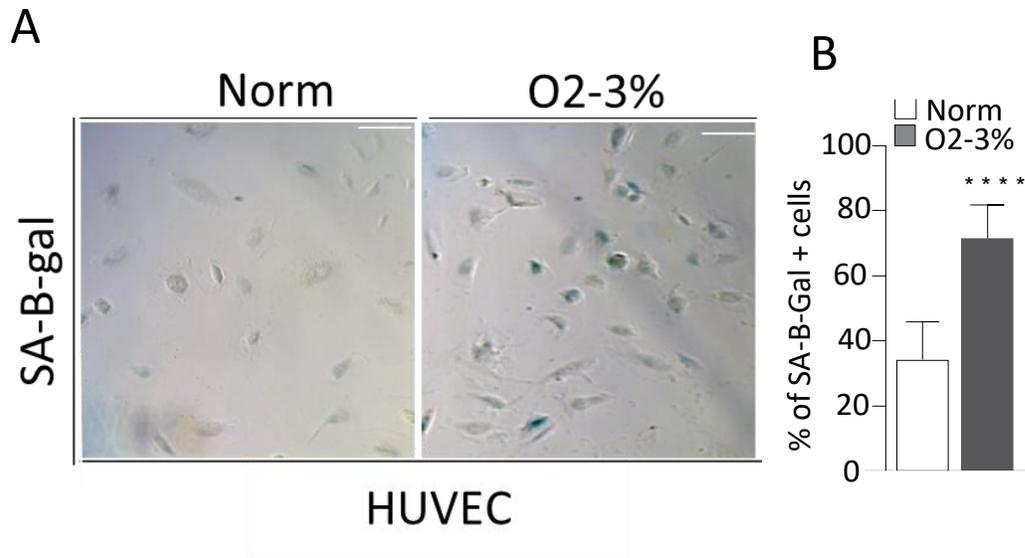


Figure supplémentaire 4.3 : Expression de la sénescence avec des cellules humaines d'origine veineuse (HUVEC) exposées à l'hypoxie (3 % O<sub>2</sub>).

(A). Marquage de la SA-B-Gal, et quantification des cellules sénescents (B). Barre d'échelle :100 $\mu$ m. (n=3). \*\*P $\leq$ 0.01 \*\*\*P $\leq$ 0.001 \*\*\*\*P $\leq$ 0.0001 (T-test), ns P $\leq$ 0,05.

## ANNEXE E

### Marquage SA- $\beta$ -Galactosidase de fibroblastes embryonnaires exposés à l'hypoxie

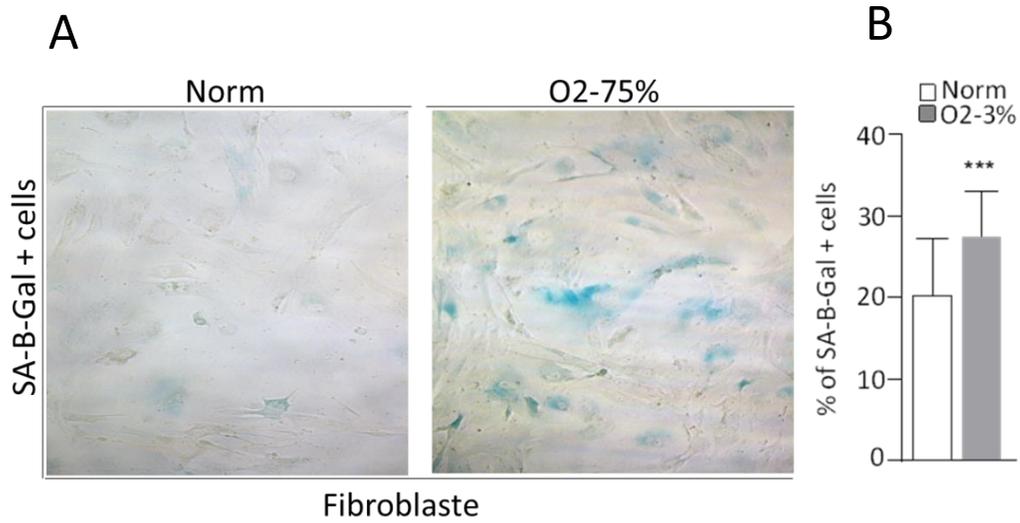


Figure supplémentaire 4.4 : Expression de la sénescence avec des fibroblastes embryonnaires exposées à l'hypoxie (3% O<sub>2</sub>).

(A). Marquage de la SA-B-Gal, et quantification des cellules sénescents (B). Barre d'échelle: 100  $\mu$ m (n=3).  
\*\*P $\leq$ 0.01 \*\*\*P $\leq$ 0.001 \*\*\*\*P $\leq$ 0.0001 (T-test), ns P $\leq$ 0,05.

## ANNEXE F

### Régression des vaisseaux hyaloïdes après P8

#### Hyaloid

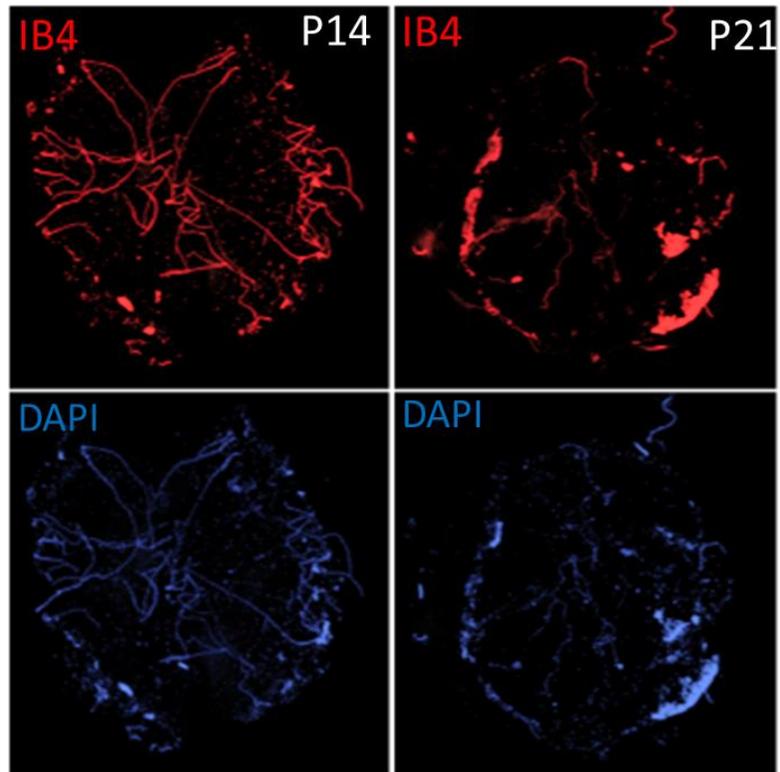


Figure supplémentaire 4.5 : Illustration de la régression postnatale des vaisseaux hyaloïdes P14, P21.

## BIBLIOGRAPHIE

Adams, R. H. et Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(6), 464-478.

Karima Ait Aissa. (2012). Étude de l'implication des cellules musculaires lisses vasculaires dans la distensibilité et le phénotype thrombotique dans des modèles murins Université de Lorraine.

Assaker, G. (2015). Étude de la régulation de l'activité du ligand Delta dans le cadre de la signalisation Notch.

Aveugles (CCA), C. C. d. (2021). Le coût de la perte de vision et de l'acécité au Canada. <https://www.fightingblindness.ca/wp-content/uploads/2021/05/KG-FN-ACC-Cost-of-Vision-Loss-and-Blindness-in-Canada>.

Balmer, A. et Munier, F. (2007). Differential diagnosis of leukocoria and strabismus, first presenting signs of retinoblastoma. *Clinical Ophthalmology (Auckland, NZ)*, 1(4), 431.

Balmer, A., Zografos, L., Uffer, S. et Munier, F. (2005). Maladie de Coats et télangiectasies primaires ou secondaires. *EMC-Ophthalmologie*, 2(3), 185-201.

Beaudry-Richard, A. (2019). L'œil et ses malaises: une histoire à retracer: effet délétère de l'inflammation médiée par interleukine-1 sur le développement nerveux et vasculaire de l'œil.

Blain, J., Boucher, P. M.-J. et Parent, P. J.-L. (2017). Mécanismes de régulation de la voie NOTCH1.

Borggreffe, T. et Oswald, F. (2009). The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(10), 1631-1646.

Boucher, S., Bonifas, C. R., Mathis, T., Janin-Manificat, H., Fleury, J. et Burillon, C. (2016). Maladie de Leber-Coats: étude rétrospective sur 10 cas. *Journal Français d'Ophthalmologie*, 39(2), 133-138.

Bray, S. J. (2016). Notch signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(11), 722-735.

Brondello, J.-M., Philipot, D., Djouad, F., Jorgensen, C. et Noël, D. (2010). Cellular senescence is a common characteristic shared by preneoplastic and osteo-arthritic tissue. *The Open Rheumatology Journal*, 4, 10.

Brondello, J.-M., Prieur, A., Philipot, D., Lemaitre, J.-M., Lenaers, G., Piette, J. et Dulić, V. (2012). La sénescence cellulaire-Un nouveau mythe de Janus? *médecine/sciences*, 28(3), 288-296.

Bruno, E., Manoukian, S., Venturelli, E., Oliverio, A., Rovera, F., Iula, G., Morelli, D., Peissel, B., Azzolini, J. et Roveda, E. (2018). Adherence to Mediterranean diet and metabolic syndrome in BRCA mutation carriers. *Integrative Cancer Therapies*, 17(1), 153-160.

Campisi, J. et d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 729-740.

Checchin, D., Sennlaub, F., Levavasseur, E., Leduc, M. et Chemtob, S. (2006). Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47(8), 3595-3602.

Chen, Z. Y., Battinelli, E. M., Fielder, A., Bunday, S., Sims, K., Breakefield, X. O. et Craig, I. W. (1993). A mutation in the Norrie disease gene (NDP) associated with X-linked familial exudative vitreoretinopathy. *Nature Genetic*, 5(2), 180-183. <https://doi.org/10.1038/ng1093-180>.

Collado, M., Blasco, M. A. et Serrano, M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*, 130(2), 223-233.

Collado, M. et Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature Reviews Cancer*, 10(1), 51-57.

Colton, C. A. et Gilbert, D. L. (1987). Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS letters*, 223(2), 284-288.

Creuzet, S. et Etchevers, H. (2017). Embryology of the eye. *arXiv preprint arXiv:1709.04272*.

Cross, M. J., Dixelius, J., Matsumoto, T. et Claesson-Welsh, L. (2003). VEGF-receptor signal transduction. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(9), 488-494.

Daruich, A., Bremond-Gignac, D., Behar-Cohen, F. et Kermorvant, E. (2020). Rétinopathie du prématuré: de la prévention au traitement. *médecine/sciences*, 36(10), 900-907.

Dejana, E. (2010). The role of wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis. *Circulation Research*, 107(8), 943-952.

Duparc, R.-H. (2005). Études moléculaires du rôle de Pax6 lors du développement de la rétine et des cellules souches rétiniennes.

Edlund, H. (2002). Pancreatic organogenesis—developmental mechanisms and implications for therapy. *Nature Reviews Genetics*, 3(7), 524-532.

Eichmann, A. (2008). La signalisation Delta-Notch freine l'angiogenèse. *La lettre du Collège de France* (24), 16.

Ellisen, L. W., Bird, J., West, D. C., Soreng, A. L., Reynolds, T. C., Smith, S. D. et Sklar, J. (1991). TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*, 66(4), 649-661.

Even, B. (2018). Rôle du stress oxydant dans la sénescence des fibroblastes pulmonaires au cours de la broncho-pneumopathie chronique obstructive Paris Est.

Fantin, A., Vieira, J. M., Gestri, G., Denti, L., Schwarz, Q., Prykhozhij, S., Peri, F., Wilson, S. W. et Ruhrberg, C. (2010). Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 116(5), 829-840.

Fischer, A. et Gessler, M. (2007). Delta–Notch and then Protein interactions and proposed modes of repression by HES and HEY bHLH factors. *Nucleic acids research*, 35(14), 4583-4596.

Friedlander, M. (2007). Fibrosis and diseases of the eye. *The Journal of clinical investigation*, 117(3), 576-586.

GENERAL, A. i. (2017). Rétinopathie des prématurés. <https://clemedicine.com/67-retinopathie-des-prematures>

Green, M. (1998). *Pediatric diagnosis: interpretation of symptoms and signs in children and adolescents*. WB Saunders Company.

Hayflick, L. et Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25, 585-621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6).

Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P., Chen, D. J. et Sedivy, J. M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21CIP1, but not p16INK4a. *Molecular cell*, 14(4), 501-513.

Hoare, M., Ito, Y., Kang, T.-W., Weekes, M. P., Matheson, N. J., Patten, D. A., Shetty, S., Parry, A. J., Menon, S. et Salama, R. (2016). NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nature cell biology*, 18(9), 979-992.

Hoare, M. et Narita, M. (2017). NOTCH and the 2 SASPs of senescence. *Cell cycle*, 16(3), 239-240.

Hosseinali-Sarjany, N. (2021). Caractérisation de la sénescence cellulaire durant le développement embryonnaire de l'axolotl.

Ito, M. et Yoshioka, M. (1999). Regression of the hyaloid vessels and pupillary membrane of the mouse. *Anatomy and Embryology*, 200(4), 403-411.

Jang, J., Choi, Y., Choi, J., Lee, K., Chung, H., Jeon, S. et Seong, R. (2006). Notch1 confers thymocytes a resistance to GC-induced apoptosis through Deltex1 by blocking the recruitment of p300 to the SRG3 promoter. *Cell Death & Differentiation*, 13(9), 1495-1505.

Joiner, D. M., Ke, J., Zhong, Z., Xu, H. E. et Williams, B. O. (2013). LRP5 and LRP6 in development and disease. *Trends Endocrinol Metab*, 24(1), 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.10.003>.

Kassumeh, S., Weber, G. R., Nobl, M., Priglinger, S. G. et Ohlmann, A. (2021, Aug). The neuroprotective role of Wnt signaling in the retina. *Neural Regen Research*, 16(8), 1524-1528. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.303010>.

Kastner, P. et Chan, S. (2006). La voie Notch au centre du mécanisme de leucémogénèse dans un modèle murin de leucémies T. *M/S: Médecine Sciences*, 22(8-9), 708-710.

klein, d. (1972). Le questionnaire genetique. L'heredite de la maladie de norrie (pseudogliome de la retine lie au sexe) et l'importance du conseil genetique aux parents des atteints.

Kolb, B., Whishaw, I. Q. et Teskey, G. C. (2019). Cerveau et comportement. De Boeck Supérieur

Kopan, R. (2012). Notch signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(10), 011213.

Kume, T. (2009, Nov 16). Novel insights into the differential functions of Notch ligands in vascular formation. *J Angiogenes Research*, 1, 8. <https://doi.org/10.1186/2040-2384-1-8>.

Lagrange, F. (1893). Etudes sur les tumeurs de l'oeil, de l'orbite et des annexes. Steinheil.

LeBon, L., Lee, T. V., Sprinzak, D., Jafar-Nejad, H. et Elowitz, M. B. (2014). Fringe proteins modulate Notch-ligand cis and trans interactions to specify signaling states. *Elife*, 3, e02950.

Limbourg, F. P., Takeshita, K., Radtke, F., Bronson, R. T., Chin, M. T. et Liao, J. K. (2005). Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis. *Circulation*, 111(14), 1826-1832. <https://doi.org/10.1161/01.Cir.0000160870.93058.Dd>

Liu, C. et Nathans, J. (2008). An essential role for frizzled 5 in mammalian ocular development.

Liu, C. H., Wang, Z., Sun, Y. et Chen, J. (2017). Animal models of ocular angiogenesis: from development to pathologies. *The FASEB Journal*, 31(11), 4665-4681.

Lobov, I. B., Rao, S., Carroll, T. J., Vallance, J. E., Ito, M., Ondr, J. K., Kurup, S., Glass, D. A., Patel, M. S. et Shu, W. (2005). WNT7b mediates macrophage-induced programmed cell death in patterning of the vasculature. *Nature*, 437(7057), 417-421.

Lowell, S., Jones, P., Le Roux, I., Dunne, J. et Watt, F. M. (2000). Stimulation of human epidermal differentiation by Delta–Notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters. *Current Biology*, 10(9), 491-500.

Malaise, O., Paulissen, G., Deroyer, C., Ciregia, F., Poulet, C., Lechanteur, C., Brondello, J.-M., De Seny, D. et Malaise, M. (2021). Influence des glucocorticoïdes sur les caractéristiques de la sénescence cellulaire dans les fibroblastes synoviaux d'origine arthrosique. *Revue du Rhumatisme*, 88, A157.

Meola, S. (2011). Lésions intraoculaires chez l'enfant: le rétinoblastome et le diagnostic différentiel Université de Lausanne, Faculté de biologie et médecine.

Miloudi, K., Oubaha, M., Ménard, C., Dejda, A., Guber, V., Cagnone, G., Wilson, A. M., Tétreault, N., Mawambo, G. et Binet, F. (2019). NOTCH1 signaling induces pathological vascular permeability in diabetic retinopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(10), 4538-4547.

Morrison, S. J., Perez, S. E., Qiao, Z., Verdi, J. M., Hicks, C., Weinmaster, G. et Anderson, D. J. (2000). Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell*, 101(5), 499-510.

Mullendore, M. E., Koorstra, J.-B., Li, Y.-M., Offerhaus, G. J., Fan, X., Henderson, C. M., Matsui, W., Eberhart, C. G., Maitra, A. et Feldmann, G. (2009). Ligand-dependent Notch signaling is involved in tumor initiation and tumor maintenance in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, 15(7), 2291-2301.

Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J. et Collado, M. (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*, 155(5), 1104-1118.

Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M. et Serrano, M. (2013, Nov 21). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*, 155(5), 1104-1118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.019>

Muñoz-Espín, D. et Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 15(7), 482-496.

Natung, T., Venkatesh, P., Thangkhiew, L. et Syiem, J. (2013, May 1, 2013). Asymmetric presentations of familial exudative vitreoretinopathy Clinical Image. *Oman Journal of Ophthalmology*, 6(2), 129-130. <https://doi.org/10.4103/0974-620x.116661>

Newman, E. et Reichenbach, A. (1996). The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends in Neurosciences*, 19(8), 307-312.

Ng, H. L., Quail, E., Cruickshank, M. N. et Ulgiati, D. (2021). To be, or notch to be: mediating cell fate from embryogenesis to lymphopoiesis. *Biomolecules*, 11(6), 849.

OMS. (2019, 8 Octobre 2019). *Rapport mondial sur la vision* Rapport. (ISBN :9789241516570). <https://www.who.int/publications/i/item/9789241516570>.

Outtz, H. H., Tattersall, I. W., Kofler, N. M., Steinbach, N. et Kitajewski, J. (2011, Sep 22). Notch1 controls macrophage recruitment and Notch signaling is activated at sites of endothelial cell anastomosis during retinal angiogenesis in mice. *Blood*, 118(12), 3436-3439. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-327015>

Parikh, P., Britt, R. D., Jr., Manlove, L. J., Wicher, S. A., Roesler, A., Ravix, J., Teske, J., Thompson, M. A., Sieck, G. C., Kirkland, J. L., LeBrasseur, N., Tschumperlin, D. J., Pabelick, C. M. et Prakash, Y. S. (2019, Jul). Hyperoxia-induced Cellular Senescence in Fetal Airway Smooth Muscle Cells. *Am J Respir Cell Molecular Biologie*, 61(1), 51-60. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0176OC>

Plentz, R., Park, J. S., Rhim, A. D., Abravanel, D., Hezel, A. F., Sharma, S. V., Gurumurthy, S., Deshpande, V., Kenific, C. et Settleman, J. (2009). Inhibition of  $\gamma$ -secretase activity inhibits tumor progression in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology*, 136(5), 1741-1749. e1746.

Poulter, J. A., Ali, M., Gilmour, D. F., Rice, A., Kondo, H., Hayashi, K., Mackey, D. A., Kearns, L. S., Ruddle, J. B., Craig, J. E., Pierce, E. A., Downey, L. M., Mohamed, M. D., Markham, A. F., Inglehearn, C. F. et Toomes, C. (2010). Mutations in TSPAN12 cause autosomal-dominant familial exudative vitreoretinopathy. *Am J Hum Genet*, 86(2), 248-253. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.01.012>

Promelle, V. et Milazzo, S. (2017). Rétinopathie du prématuré. *Journal Français d'Ophthalmologie*, 40(5), 430-437.

Qu, X., Afelik, S., Jensen, J. N., Bukys, M. A., Kobberup, S., Schmerr, M., Xiao, F., Nyeng, P., Albertoni, M. V. et Grapin-Botton, A. (2013). Notch-mediated post-translational control of Ngn3 protein stability regulates pancreatic patterning and cell fate commitment. *Developmental Biology*, 376(1), 1-12.

Radtke, F. et Raj, K. (2003). The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 756-767.

Rattner, A., Williams, J. et Nathans, J. (2019). Roles of HIFs and VEGF in angiogenesis in the retina and brain. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(9), 3807-3820.

Redslob, E. (1932). Le corps vitré: son développement, sa structure, ses propriétés physico-chimiques. Masson Paris.

Robinson, C. J., Mulloy, B., Gallagher, J. T. et Stringer, S. E. (2006). VEGF165-binding sites within heparan sulfate encompass two highly sulfated domains and can be liberated by K5 lyase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(3), 1731-1740.

Rodier, F. et Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *Journal of Cell Biology*, 192(4), 547-556.

Schmitt, C. A., Fridman, J. S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R. M. et Lowe, S. W. (2002). A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell*, 109(3), 335-346.

Sciacca, S., Pilato, M., Mazzoccoli, G., Paziienza, V. et Vinciguerra, M. (2013). Anti-correlation between longevity gene SirT1 and Notch signaling in ascending aorta biopsies from patients with bicuspid aortic valve disease. *Heart and Vessels*, 28(2), 268-275.

Serrano, M. et Blasco, M. A. (2007). Cancer and ageing: convergent and divergent mechanisms. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(9), 715-722.

Sontakke, Y. (2021). *Embryologie de l'oeil*.

Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M. C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V. et Sharpe, J. (2013). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*, 155(5), 1119-1130.

Suchting, S., Freitas, C. et Eichmann, A. (2007). Angiogenesis under Delta-Notch couple control. *Medecine Sciences: M/S*, 23(4), 347-348.

Suchting, S., Freitas, C., le Noble, F., Bedito, R., Bréant, C., Duarte, A. et Eichmann, A. (2007). The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9), 3225-3230.

Tanzariello, s. m. (2004). Sindrome di norrie ndp, sindrome di norrie-warburg , pseudoglioma , atrofia bulborum ereditaria , episkopi cecità. <http://otorino-tanzariello.it/sindrome-di-norrie>.

Teo, Y. V., Rattanavirotkul, N., Olova, N., Salzano, A., Quintanilla, A., Tarrats, N., Kiourtis, C., Müller, M., Green, A. R., Adams, P. D., Acosta, J. C., Bird, T. G., Kirschner, K., Neretti, N. et Chandra, T. (2019). Notch Signaling Mediates Secondary Senescence. *Cell Report*, 27(4), 997-1007.e1005. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.104>.

Toomes, C., Bottomley, H. M., Jackson, R. M., Towns, K. V., Scott, S., Mackey, D. A., Craig, J. E., Jiang, L., Yang, Z., Trembath, R., Woodruff, G., Gregory-Evans, C. Y., Gregory-Evans, K., Parker, M. J., Black, G. C., Downey, L. M., Zhang, K. et Inglehearn, C. F. (2004). Mutations in LRP5 or FZD4 underlie the common familial exudative vitreoretinopathy locus on chromosome 11q. *Am J Hum Genet*, 74(4), 721-730. <https://doi.org/10.1086/383202>.

Tsang, S. H. et Sharma, T. (2018). Retinitis pigmentosa (non-syndromic). *Atlas of inherited retinal diseases*, 125-130.

Vaziri, H., West, M. D., Allsopp, R. C., Davison, T. S., Wu, Y.-S., Arrowsmith, C. H., Poirier, G. G. et Benchimol, S. (1997). ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly (ADP-ribose) polymerase. *The EMBO journal*, 16(19), 6018-6033.

Wang, Z., Liu, C.-H., Huang, S. et Chen, J. (2019). Assessment and characterization of hyaloid vessels in mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(147), e59222.

Xu, Q., Wang, Y., Dabdoub, A., Smallwood, P. M., Williams, J., Woods, C., Kelley, M. W., Jiang, L., Tasman, W. et Zhang, K. (2004). Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell*, 116(6), 883-895.