



Thèse

2024

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

L'insuffisance de collagène V dans un modèle murin du syndrome d'Ehlers Danlos affecte les propriétés biomécaniques viscoélastiques expliquant les cornées fines et fragiles

De Almeida Torres, Emilio

How to cite

DE ALMEIDA TORRES, Emilio. L'insuffisance de collagène V dans un modèle murin du syndrome d'Ehlers Danlos affecte les propriétés biomécaniques viscoélastiques expliquant les cornées fines et fragiles. Doctoral Thesis, 2024. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:181057

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:181057>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:181057](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:181057)

Faculté de Médecine

Section de médecine Clinique,

Fondamentale, ou Dentaire

Département d'Ophtalmologie

Thèse préparée sous la direction du Prof. Dr. Dr. med. Farhad Hafezi, FARVO

" L'insuffisance de collagène V dans un modèle murin du syndrome d'Ehlers Danlos affecte les propriétés biomécaniques viscoélastiques expliquant les cornées fines et fragiles "

Thèse

présentée à la Faculté de Médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur en médecine
par

Emilio DE ALMEIDA TORRES
de

Zürich (Zürich)

Thèse n° 11250

Nature Scientific Reports
2021

DOCTORAT EN MEDECINE

Thèse de :

Emilio DE ALMEIDA TORRES

originaire de Zürich (ZH), Suisse

Intitulée :

**L'insuffisance de collagène V dans un modèle murin du
syndrome d'Ehlers Danlos affecte les propriétés
biomécaniques viscoélastiques expliquant les cornées
fines et fragiles**

La Faculté de médecine, sur le préavis du Comité directeur des thèses, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par-là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 15 octobre 2024

Thèse n° 11250

Antoine Geissbühler
Doyen



N.B. - La thèse doit porter la déclaration précédente et remplir les conditions énumérées dans les "Informations relatives à la présentation des thèses de doctorat à l'Université de Genève".

L'insuffisance de collagène V dans un modèle de souris pour le syndrome d'Ehlers Danlos affecte les propriétés biomécaniques viscoélastiques expliquant les cornées minces et fragiles.

Emilio A. Torres-Netto^{*2,3,4,5,6} , Sabine Kling^{*1} , Hormoz Abdshahzadeh^{2,3,5} , Edgar M Espana⁷ , Farhad Hafezi^{2,3,5,8,9}

¹ Équipe OPTIC, Laboratoire de vision par ordinateur, ETH Zurich, Suisse

² Laboratoire de biologie cellulaire oculaire, CABMM, Université de Zurich, Zurich, Suisse

³ ELZA Institute AG, Dietikon/Zurich, Suisse

⁴ Département d'ophtalmologie, École de médecine Paulista, Université fédérale de São Paulo, São Paulo, Brésil

⁵ Faculté de médecine, Université de Genève, Genève, Suisse

⁶ Département d'ophtalmologie, Hôpital universitaire de Zurich, Université de Zurich, Zurich, Suisse

⁷ Département d'ophtalmologie, Morsani College of Medicine, University of South Florida , Tampa, FL, USA

⁸ Département d'ophtalmologie, USC Roski Eye Institute, Keck School of Medicine, USC Los Angeles, USA

⁹ Département d'ophtalmologie, Université médicale de Wenzhou, Wenzhou, Chine

*SK et ETN ont contribué à parts égales aux travaux présentés ici.

Mots-clés :

Ehlers Danlos ; biomécanique cornéenne ; kératocône ; modèle de souris

Correspondence

Emilio De Almeida Torres, Webereistrasse 28953 Dietikon/Zurich, Suisse
emilioatorres@me.com

Divulgarion financière :

ET (aucune), SK (aucune), HA (aucune), EME (aucune), FH (aucune)

Remerciements :

Cette étude a été financée par le Fonds national suisse de la recherche scientifique (Ambizione PZooP2_174113 à SK), par la Fondation Velux, Suisse (ET/FH), par la Fondation Light for Sight (HA, FH), et par la subvention NIH/NEI EY029395 à EME.

Table des matières

1. Résumé.....	5
2. Introduction.....	7
3. Matériels et méthodes	10
3.1. Animaux	10
3.2. Elastographie par cohérence optique (OCE)	10
3.3. Extensométrie bidimensionnel (2D)	11
3.4. Microscopie à génération de seconde harmonique du stroma cornéen	12
3.5. Analyse statistique	13
4. Résultats	13
4.1. Elastographie par cohérence optique (OCE)	13
4.2. Extensométrie bidimensionnel (2D)	14
4.3. Imagerie de la génération de seconde harmonique	15
5. Discussion	15
6. References	20
7. Figures	21
8. Rapport du directeur de these.....	26

1. Résumé

Le syndrome d'Ehlers-Danlos (EDS) est une maladie autosomique dominante du tissu conjonctif qui affecte principalement la peau et les articulations, et généralement caractérisée par une hypermobilité articulaire, une hyperextensibilité cutanée et une fragilité tissulaire. L'amincissement cornéen est une observation courante dans le type classique du EDS[1, 2], ainsi qu'une cornée abrupte, mais sans incidence plus élevée de kératocône.[3]

À un niveau moléculaire, le type classique du EDS résulte d'une mutation dans COL5A1 et COL5A2. Le collagène V est présent dans le stroma cornéen et constitue environ 10 à 20% de son contenu en collagène.[4] Le collagène V est responsable de la formation de fibrilles hétérotypiques avec le collagène I.[5, 6] Il est considéré comme responsable du faible diamètre des fibrilles cornéennes.[6, 7] Un modèle de souris COL5A1-haploinsuffisant pour le EDS classique, avec une réduction de 49% du contenu en collagène V, a été trouvé pour avoir une cornée 26% plus mince.[1]

La biomécanique cornéenne dans le EDS classique est d'une pertinence translationnelle en raison de cette contradiction apparente entre un amincissement cornéen significatif et l'incidence normale de l'ectasie cornéenne. Dans cette étude, nous mesurons pour la première fois, selon nos connaissances, les propriétés biomécaniques de la cornée dans un modèle murin représentatif du EDS de type classique, tout en comparant deux méthodes de mesure distinctes.

L'étude a mené une élastographie optique en quasi-statique (OCE) de manière non invasive pendant la modulation de la pression ambiante par -3 mmHg. Des mesures d'extensométrie 2D ont été réalisées de manière invasive, comprenant un cycle de pré-conditionnement, un test de relaxation du stress et un test de rupture.

Sur un total de 28 yeux provenant d'un modèle murin Col5a1+/- et de souris témoins C57BL/6 (wt), les cornées Col5a1+/- étaient plus minces que les témoins (125 ± 11 vs

148±10 µm, $p<0.001$). Le module d'élasticité à court terme était significativement augmenté en OCE (506±88 vs 430±103 kPa, $p=0.023$), et la même tendance a été observée en extensométrie 2D (30.7±12.1 kPa vs 21.5±5.7, $p=0.057$). En revanche, lors des tests de relaxation du stress, les cornées Col5a1+/- ont présenté une relaxation plus forte (55% vs 50%, $p=0.01$), et dans les images SGH, un étalement avant accru indiquant une organisation désordonnée des fibrilles de collagène a été observé.

Nous proposons que l'organisation perturbée du collagène dans les cornées déficientes en COL5A1 affecte les propriétés viscoélastiques. Les résultats présentés ici soutiennent les observations cliniques, dans lesquelles les cornées minces avec des altérations ultrastructurales globales maintiennent une forme cornéenne normale.

Emilio DE ALMEIDA TORRES

2. Introduction

Le syndrome d'Ehlers-Danlos (EDS) est une maladie du tissu conjonctif qui affecte principalement la peau et les articulations et se caractérise généralement par une hypermobilité des articulations, une hyperextensibilité de la peau et une fragilité des tissus.

Sa prévalence estimée est de 1 individu sur 5000, mais sa réelle prévalence pourrait être sous-estimée en raison de la variabilité des présentations cliniques et du manque de sensibilisation parmi les professionnels de la santé.[8] Les symptômes extra-oculaires incluent une peau fragile, une cicatrisation déficiente, des ecchymoses faciles et des complications articulaires telles que des entorses et des luxations. Des altérations musculaires et squelettiques peuvent également survenir, et la dilatation de l'aorte ainsi que la proéminence de la valve mitrale ont également été décrites.[9]

Le EDS représente un ensemble hétérogène de maladies héréditaires du tissu conjonctif, caractérisées par des altérations de la synthèse ou de la structure du collagène et d'autres composants matriciels. La diversité des manifestations cliniques associées au EDS, notamment au niveau cutané, articulaire et vasculaire, exige une approche diagnostique rigoureuse, fondée sur une classification précise. Depuis la mise à jour de la classification internationale en 2017, élaborée par Malfait et al.[10], il est désormais reconnu que le EDS comprend 13 sous-types distincts, chacun associé à des mutations spécifiques affectant diverses protéines du tissu conjonctif. Cette nouvelle nomenclature remplace l'ancienne classification de Villefranche de 1998, qui avait simplifié l'identification des formes principales de EDS, mais ne tenait pas compte de l'hétérogénéité génétique aujourd'hui mieux comprise.

Des anomalies ophtalmiques et neuro-ophtalmiques peuvent survenir dans le cadre du syndrome d'Ehlers-Danlos. L'amincissement de la cornée est décrit comme un phénomène courant dans les EDS classiques,[1, 2] qui s'accompagne d'une cornée raide, mais pas d'une incidence plus élevée de kératocône.[3] D'autre part, la

contradiction réside dans le fait que les patients EDS ont généralement une cornée plus fine et plus courbée que la normale, ce qui est caractéristique des ectasies cornéennes telles que le kératocône.[11]

Un point important à considérer est que chaque type de EDS présente un pronostic et une prise en charge distincts, justifiant ainsi l'importance de différencier ces sous-types lors de l'évaluation clinique. Le développement de technologies de séquençage avancées a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents et d'optimiser les stratégies thérapeutiques et de surveillance en fonction du sous-type spécifique. C'est la compréhension actuelle, tandis qu'auparavant, cette distinction n'était pas aussi claire. Par exemple, le EDS classique, lié à des mutations dans le gène COL5A1 ou COL5A2 codant pour le collagène de type V, se distingue par une hyperélasticité cutanée et une laxité articulaire. Cependant, il n'est généralement pas associé à une augmentation significative du risque de pathologies oculaires graves comme le kératocône progressif ou le kératoglobe. Il est également essentiel de noter que d'autres formes de EDS, telles que le EDS vasculaire, qui est dû à des mutations dans le gène COL3A1 du collagène de type III, peuvent également entraîner des manifestations oculaires, bien que cela soit moins fréquent. Le syndrome de la cornée fragile (Brittle Cornea Syndrome), une forme récessive autosomique rare du EDS, se caractérise par une fragilité cornéenne majeure, prédisposant les patients à des complications oculaires sévères. Par conséquent, la distinction entre ces différentes formes de EDS ne repose pas seulement sur la présentation clinique, mais aussi sur des bases génétiques précises.[10] Le Syndrome de Cornée Fragile (BCS) est caractérisé par plusieurs critères majeurs, notamment une cornée fine (souvent inférieure à 400 µm d'épaisseur), un kératocône progressif précoce, un kératoglobe progressif précoce et des sclères bleues.[10] Toutefois, un chevauchement clinique avec d'autres conditions similaires peut se produire. Pour clarifier le BCS, il existe une corrélation avec le dépistage moléculaire par séquençage ciblé de gènes comme ZNF469 et PRDM5, ainsi que d'autres gènes potentiellement impliqués. Cependant, l'absence de ces résultats ne permet pas toujours d'exclure le BCS, car certaines

mutations, comme les mutations introniques profondes, peuvent échapper aux techniques standards, et des gènes encore inconnus pourraient être concernés. Face à ces complexités, l'étude a choisi de se concentrer sur la forme classique de la maladie afin de mieux comprendre ses caractéristiques fondamentales ainsi que ses aspects biomécaniques.

Classiquement, la physiopathologie du syndrome d'Ehlers-Danlos est causée par des défauts dans la structure primaire, le traitement ou la modification des types de procollagène fibrillaire I, III et V.[8] Au niveau moléculaire, le EDS de type classique résulte d'une mutation dans COL5A1 et COL5A2, responsables respectivement des chaînes $\alpha_1(V)$ et $\alpha_2(V)$ du collagène [3, 9] Selon une hypothèse, ces mutations entraînent une haplo-insuffisance de COL5A1 et conduisent à la production d'environ la moitié de la quantité normale de collagène de type V. [3]

Le collagène V est présent dans le stroma cornéen et représente environ 10 à 20 % de son contenu en collagène, voir revue.⁴ Le collagène V est responsable de la formation de fibrilles hétérotypiques avec le collagène I.^{5,6} Le collagène V est considéré comme responsable du petit diamètre des fibrilles cornéennes.^{6,7} *En outre, un* modèle de souris COL5A1-haploinsuffisante pour le EDS classique, avec une teneur en collagène V réduite de 49 %, s'est avéré avoir une cornée 26 % plus fine.[1]

La compréhension de la biomécanique de la cornée dans le syndrome d'Ehlers-Danlos (EDS) revêt une grande importance pour son application clinique, notamment en raison de la contradiction apparente entre l'amincissement significatif de la cornée observé et l'incidence normale de l'ectasie cornéenne. Cette contradiction soulève des questions fondamentales sur les mécanismes sous-jacents de l'affaiblissement tissulaire dans l'EDS, ainsi que sur les facteurs qui contribuent à la résistance structurelle de la cornée dans ce contexte. Comprendre ces aspects de la biomécanique cornéenne peut non seulement aider à expliquer les manifestations oculaires observées dans l'EDS, mais également à guider le développement de

stratégies de prévention et de traitement plus efficaces pour ces complications oculaires.

Ainsi, c'est dans cette optique que nous nous attelons, pour la première fois à notre connaissance, à la quantification des propriétés biomécaniques de la cornée dans un modèle murin de syndrome d'Ehlers-Danlos (EDS) de type classique, tout en procédant à une comparaison entre deux approches de mesure distinctes.

3. Matériels et méthodes

3.1. Animaux

Un modèle de souris *Col5a1*-haploinsuffisante de EDS classique a été utilisé dans cette étude.¹⁴ Au total, 14 souris hétérozygotes pour le collagène V (*Col5a1*^{+/-}) et 14 souris de type sauvage (wt) ont été analysées. Tous les animaux utilisés étaient des adultes mâles âgés d'environ 60 jours. Les expériences ont été menées conformément à la déclaration de l'ARVO concernant l'utilisation d'animaux dans la recherche ophtalmologique et visuelle. L'analyse biomécanique a d'abord été réalisée dans les globes oculaires intacts à l'aide de l'élastographie par cohérence optique, puis dans des boutons de cornée disséqués à l'aide de l'extensométrie 2D contrainte-déformation.

3.2. Élastographie par cohérence optique (OCE)

Nous avons précédemment développé une approche d'imagerie non invasive pour évaluer la rigidité de la cornée par l'utilisation de la modulation de la pression ambiante. Cette approche a été démontrée pour récupérer les différents modèles d'irradiation utilisés pour le traitement CXL dans les yeux de rats.[12] Les mesures OCE ont été effectuées dans l'ensemble du globe oculaire en utilisant la modulation de la pression ambiante selon la même technique.[12] En bref, l'œil a été placé dans

une chambre à pression scellée qui était reliée à une seringue de 1 ml et à une colonne d'eau en forme de U. Un scanner B de référence composé de 1 000 images par seconde a été réalisé. Un scan B de référence composé de 1000 scans A enregistrés à une vitesse de 10kHz a été capturé à la pression atmosphérique normale (1013 hPa). Ensuite, la pression à l'intérieur de la chambre a été réduite de 3 mmHg et un deuxième balayage B déformé a été enregistré avec les mêmes paramètres. L'analyse de la différence de phase a été effectuée sur les deux scans B et convertie en déformation axiale induite $\Delta\epsilon_{oct}$. L'épaisseur centrale de la cornée (cct) a été extraite du scan OCT. La contrainte cornéenne σ_{oct} résultant de la modulation de pression Δp a été déterminée à l'aide de l'équation de Laplace[13] :

$$\Delta\sigma_{oct} = \frac{\Delta p \cdot R}{2 \cdot cct}$$

où $R = 1,5$ mm est le rayon de la cornée. Enfin, le module d'élasticité E_{oct} a été estimé à partir de

$$E_{oct} = \frac{\Delta\sigma_{oct}}{\Delta\epsilon_{oct}}$$

3.3. Extensométrie bidimensionnel (2D)

Notre groupe a récemment mis au point une nouvelle méthode pour effectuer des mesures d'extensométrie 2D de la contrainte et de la déformation dans les cornées murines. Grâce à cette technique, nous avons pu démontrer que la réticulation de la cornée (CXL) augmente de manière significative la rigidité de la cornée chez la souris.[14] Les mesures d'extensométrie ont été effectuées sur des cornées excisées de manière circonférentielle près du limbe. Les boutons de cornée ont été fixés dans un support 2D comme décrit précédemment.[14] Une goutte de PBS a été appliquée sur l'ouverture du support pour éviter la déshydratation pendant les tests. L'analyse

biomécanique a été réalisée en trois étapes : (1) cycle de pré-conditionnement avec trois répétitions de test de contrainte-déformation entre 0,04 et 0,4 N ; (2) test de contrainte-relaxation pendant 120 secondes pendant l'application d'une force initiale de 0,4 N ; et (3) test de rupture avec une charge croissante de 0,4 à 4,0 N. La contrainte cornéenne induite par la charge d'essai F a été déterminée par[14]

$$\sigma_{ext} = \frac{F}{2\pi \cdot R \cdot cct}$$

où cct est l'épaisseur centrale de la cornée déterminée à partir des mesures OCT. La contrainte de traction correspondante a été calculée à partir de la distance de déplacement axial Δl du pénétrateur

$$\varepsilon_{ext} = \frac{\Delta l^2 + R^2}{2\Delta l \cdot R} \cdot \sin\left(\frac{2\Delta l \cdot R}{\Delta l^2 + R^2}\right) - 1$$

Enfin, le module E E_{ext} a été déterminé à partir de la pente moyenne du diagramme contrainte-déformation entre 10 et 15 % de déformation.

3.4. Microscopie à génération de seconde harmonique du stroma cornéen

Les yeux énucléés ont été immédiatement placés dans un milieu Optisol sur une chambre en verre faite sur mesure et imagés (dans les 5 minutes) sans aucune manipulation de tissu ou dissection supplémentaire. Les coupes transversales de la cornée ont été imagées à l'aide d'un microscope Olympus MPE-RS équipé d'un objectif à immersion d'eau 25X (0,95 NA) (Olympus). Les signaux SHG à deux photons ont été générés à l'aide d'un laser titane : saphir verrouillé en mode à 960 nm. Les signaux SHG diffusés vers l'avant et traversant les sections cornéennes ont été recueillis à l'aide d'un condensateur de 0,8 NA muni d'un filtre passe-bande étroit (465 - 485 nm). Les signaux SHG diffusés vers l'arrière ont été détectés à l'aide d'un filtre passe-bande (460 - 500 nm). Tous les échantillons ont été scannés en utilisant un pas de 2 μ m sur

l'axe z, de l'arrière vers l'avant de la section. Dix tranches continues ont été sélectionnées au hasard dans une pile d'images obtenues à partir du stroma cornéen central et analysées à l'aide d'image J. Une valeur moyenne d'intensité de pixel a été obtenue à partir de chaque tranche.

3.5. *Analyse statistique*

La normalité de la distribution des données a été vérifiée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. En cas de distribution normale, les paramètres ont été comparés à l'aide d'un test t indépendant de Student bilatéral, sinon à l'aide du test U de Mann-Whitney pour échantillons indépendants. Les valeurs P inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

4. Résultats :

4.1. *Élastographie par cohérence optique (OCE)*

La tomographie par cohérence optique a été utilisée pour l'imagerie non invasive de la structure et de la déformation. **La figure 1** montre des images représentatives des cornées *Col5a1^{+/-}* et wt. Il est clairement visible que les cornées *Col5a1^{+/-}* sont plus fines (125 ± 11 vs $148 \pm 10 \mu\text{m}$, facteur 1,2) que les cornées wt, avec une signification de $p < 0,001$. Les images de déformation de la cornée étaient relativement bruitées, c'est pourquoi, pour l'interprétation ultérieure de la déformation, la valeur moyenne dans une zone centrale de 21×21 pixels ($68 \times 63 \mu\text{m}$) a été calculée. **La figure 2 A** présente les valeurs moyennes de déformation axiale correspondantes. Aucune différence significative n'a été constatée ($-4,84 \pm 1,99$ vs $-4,93 \pm 1,92 \%$, $p = 0,799$). De manière surprenante, le module E était significativement ($p = 0,023$) plus élevé dans les

cornées *Col5a1^{+/-}* (506 ± 88 vs 430 ± 103 kPa, facteur 1,2) indiquant une rigidité mécanique plus élevée, voir **Figure 2 C**.

4.2. Extensométrie 2D

L'extensométrie destructive est une technique standard pour la caractérisation mécanique. Les mesures de relaxation sous contrainte ont pu être interprétées dans 12 des 14 cornées pures et 9 des 14 cornées *Col5a1^{+/-}*, et les mesures de contrainte-déformation ont pu être interprétées dans 11 et 8 cornées, respectivement, en raison de la rupture prématurée de l'échantillon au cours du test. Par conséquent, *Col5a1^{+/-}* présentait une susceptibilité accrue à la rupture d'environ 25 à 30 %. Les **figures 3 A** et **B** présentent les résultats de l'analyse contrainte-relaxation. Les cornées *Col5a1^{+/-}* ont présenté une diminution du stress significativement ($p=0,010$) plus importante après 100s de relaxation que les cornées wt (55% contre 50%), indiquant une relaxation plus forte et donc plus de viscosité, c'est-à-dire moins de stabilité temporelle. En ajustant une série de Prony à 3 termes aux deux courbes de relaxation, on obtient les constantes suivantes pour les cornées wt : $G_{\infty} = 1,18$ MPa, $G_1 = 0,43$ MPa, $G_2 = 0,51$ MPa, $G_3 = 0,88$ MPa, $\tau_1 = 3,15$, $\tau_2 = 515$, $\tau_3 = 1245$. Et pour les cornées het : $G_{\infty} = 1,14$ MPa, $G_1 = 0,50$ MPa, $G_2 = 0,62$ MPa, $G_3 = 1,29$ MPa, $\tau_1 = 3,15$, $\tau_2 = 565$, $\tau_3 = 575$. Les **figures 3 C** et **D** présentent les résultats de l'analyse contrainte-déformation calculée à partir de la région initiale de l'essai de rupture. De manière intéressante et similaire aux mesures OCE, les cornées *Col5a1^{+/-}* ont montré une tendance vers une courbe contrainte-déformation plus raide et donc un module E plus élevé que les cornées wt ($30,7 \pm 12,1$ kPa vs $21,5 \pm 5,7$), même si la signification statistique n'a pas été atteinte ($p=0,057$).

4.3. *Imagerie de la génération de seconde harmonique*

L'imagerie par génération de seconde harmonique a été appliquée pour démontrer l'organisation hiérarchique anormale du stroma dans une matrice déficiente en COL5A1. Pour évaluer l'influence de COL5A1 sur le collagène fibrillaire et l'organisation hiérarchique sans manipulation des tissus ou fixation chimique, nous avons étudié les stromas adultes de *Col5a1^{+/-}* et les avons comparés aux stromas WT. L'imagerie en face du stroma et des sections transversales des cornées adultes des deux groupes a été réalisée immédiatement après l'énucléation. Une augmentation du signal dispersé vers l'avant et du signal rétrodiffusé suggère une désorganisation des fibrilles, une densité de fibrilles accrue et des anomalies dans l'organisation hiérarchique des cornées *Col5a1^{+/-}* par rapport aux WT, voir **Figures 4 et 5**. Ces résultats suggèrent que *Col5a1^{+/-}* joue un rôle important dans la fibrillogénèse et l'organisation hiérarchique du stroma.

5. Discussion :

Cette étude vise à étudier l'impact biomécanique sur les cornées d'un modèle de syndrome d'Ehlers-Danlos présentant une mutation du collagène, et nous proposons que la perturbation de l'organisation du collagène dans les cornées déficientes en COL5A1 affecte leurs propriétés viscoélastiques. Les résultats présentés ici soutiennent les observations cliniques jusqu'à présent. De plus, nos analyses confirment que les cornées *Col5a1^{+/-}* représentent un modèle valide pour le EDS de type classique pour les raisons suivantes.

Premièrement, une susceptibilité accrue à la rupture de la cornée, d'environ 25-30%, a été observée. La rupture spontanée des tissus est plus typique de l'EDS de type VI, avec une mutation du collagène de type VI. Dans un groupe clinique composé de 11 patients, une rupture de la cornée s'est produite spontanément.[15] La rupture de la

cornée s'est produite spontanément ou après un traumatisme minime chez environ 35%.^[15] Cet état est également connu sous le nom d'"oculus fragilis".^[16] Il est intéressant de noter que le EDS de type classique avec a COL5A1 mutation a également été associé à une rupture artérielle spontanée.^[17] Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'hypertension concomitante chez le patient décrit a pu être un facteur précipitant de la rupture artérielle, puisque la modification des propriétés biomécaniques des parois artérielles peut favoriser la rupture sous l'effet de l'augmentation de pression.^[17] Un autre point est qu'on peut supposer qu'une mutation du collagène de type V entraîne un défaut structurel similaire à celui du type VI, sauf que la rupture se produit à des charges plus élevées et est donc moins fréquente. Mécaniquement, la rupture spontanée pourrait être attribuée à un comportement plus rigide à court terme (augmentation du module E, **Fig. 2C, 3D**), mais potentiellement plus fragile comme le tissu cornéen.

Deuxièmement, l'étude actuelle a révélé que la cornée des yeux de *Col5a1^{+/-}* était plus mince d'environ 20 %, ce qui est conforme à la littérature antérieure qui fait état d'une réduction de l'épaisseur de 26 % dans le même modèle de souris.^[1] Par rapport à un groupe clinique de patients atteints de EDS, cette caractéristique semble se manifester de manière moins prononcée chez l'homme. Ici, une réduction moyenne de 41µm a été rapportée,^[3] ce qui correspond à une réduction de l'épaisseur d'environ 8 % en supposant une épaisseur cornéenne normale de 546µm.^[11] L'amincissement de la cornée dans les cornées *Col5a1^{+/-}* pourrait être attribué à une relaxation de contrainte plus forte sous la même charge que celle appliquée dans cette étude (**Fig. 3B**), ou de manière correspondante sous une PIO normale chez les patients.

Bien que cette combinaison - c'est-à-dire une relaxation accrue en combinaison avec une fragilité accrue - puisse sembler contradictoire, elle pourrait s'expliquer par une différence d'échelle de temps : La relaxation des contraintes a été effectuée pendant 120 secondes, alors que le test de rupture n'a duré que 12 secondes (pour la région de déformation analysée). De même, la mesure de l'OCE a été effectuée en moins de 20

secondes. Cela signifie que les échelles de temps varient d'un facteur de 5 à 10. Il est normal qu'un matériau viscoélastique se comporte de manière plus rigide dans des intervalles de temps plus courts. Dans le contexte de cette étude, nous pouvons conclure que les constantes de temps viscoélastiques des cornées *Col5a1^{+/-}* sont prolongées à court terme et réduites à long terme. En d'autres termes, un impact soudain est moins amorti et peut donc conduire à une rupture. En revanche, pour les charges stables à long terme (telles que la PIO), on peut s'attendre à une plus grande relaxation et donc à des cornées plus minces. En examinant l'ajustement de la série de Prony, la différence la plus importante est observée dans le troisième terme ($G_3\tau_3$), qui reflète en effet une réduction de la constante de temps à long terme dans les cornées *Col5a1^{+/-}*.

Dans l'ensemble, les résultats des deux approches de mesure distinctes concordent en ce sens que le module E cornéen est plus élevé dans les cornées *Col5a1^{+/-}* à un temps de mesure de 10-20 s. En outre, nous pouvons nous attendre à ce que pour des durées de test encore plus courtes, la différence de module E entre les deux groupes soit encore plus élevée.

Nos résultats de microscopie SHG démontrent l'importance du collagène V dans la régulation de l'organisation hiérarchique stromale de la cornée. Segev et al[1] ont montré que les diamètres des fibrilles de collagène étaient augmentés, mais que la densité des fibrilles était diminuée dans les cornées *Col5a1^{+/-}* en utilisant la quantification de la taille et de l'espacement des fibrilles par microscopie électronique. Ces altérations de la morphologie et de la structure des fibrilles de collagène pourraient expliquer l'augmentation de la signalisation vers l'avant observée dans les cornées *Col5a1^{+/-}*. Il est possible que cette altération de la morphologie et de l'organisation hiérarchique des fibrilles s'accompagne de changements dans la mécanique des tissus. Des fibrilles plus épaisses avec un espacement interfibrillaire accru pourraient expliquer la relaxation et la fragilité accrues observées dans ce modèle de souris.

Outre l'EDS, la famille des maladies cornéennes ectatiques (kératocône, kératoglobus, dégénérescence marginale pellucide) présente un amincissement de la cornée et une altération de la biomécanique cornéenne : Cependant, bien que des associations aient été décrites entre l'EDS et le kératoglobus,[11] des séries plus importantes n'ont pas réussi à démontrer une association avec le kératocône. McDermott *et al.* ont analysé 72 yeux de 36 patients présentant un EDS confirmé génétiquement et n'ont trouvé aucun signe de kératocône.¹³ Cela pourrait être lié au fait que les cornées Col5a1^{+/-} présentent une déficience globale et homogène en collagène de type V. En outre, contrairement au kératocône, les cornées Col5a1 présentent une déficience globale et homogène en collagène de type V. En outre, contrairement aux cornées atteintes de kératocône, qui présentent un affaiblissement biomécanique localisé et des changements topographiques de la cornée, le module élastique plus élevé trouvé ici dans les cornées Col5a1^{+/-} soutient les résultats contre-intuitifs dans lesquels les cornées déficientes en collagène V sont capables de maintenir leur forme physiologique. En d'autres termes, nos résultats peuvent expliquer pourquoi les cornées minces et anormales déficientes en collagène ne présentent pas d'ectasie.

Dans les mesures OCE, les valeurs de déformation de la cornée n'étaient pas différentes entre Col5a1^{+/-} et wt, ce qui n'est pas surprenant car la déformation axiale seule ne permet pas une interprétation biomécanique, sauf si la même configuration de contrainte peut être assurée. Cependant, ce n'était pas le cas étant donné que les cornées du groupe Col5a1^{+/-} étaient 20 % plus minces que celles du groupe wt. Par conséquent, le stress résultant de la modulation de pression de 3 mmHg était plus élevé dans les cornées Col5a1^{+/-}. Le fait que le niveau de contrainte n'ait pas été ajusté en fonction de la différence d'épaisseur attendue pourrait être considéré comme une limite de cette étude. Cependant, comme la condition de charge naturelle de la cornée est la pression intraoculaire, qui est supposée être similaire chez les patients EDS et les personnes saines, l'application de la même charge de pression (ou de force) comme dans l'étude actuelle, permet une interprétation des résultats plus pertinente sur le plan physiologique.

En conclusion, une expression réduite de *Col5a1*^{+/-} dans la cornée semble affecter de manière prédominante les propriétés viscoélastiques du tissu. Les résultats présentés ici soutiennent et rationalisent l'idée que les cornées minces dont la composition de la matrice extracellulaire est altérée conservent une forme cornéenne normale pendant l'homéostasie. D'autres études sont nécessaires pour évaluer si le stress à long terme sur une matrice anormale aggrave les altérations de l'épaisseur de la cornée et facilite la protrusion du tissu.

6. References

1. Segev F, Heon E, Cole WG, Wenstrup RJ, Young F, Slomovic AR, Rootman DS, Whitaker-Menezes D, Chervoneva I, Birk DE: **Structural abnormalities of the cornea and lid resulting from collagen V mutations.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006, **47**(2):565-573.
2. Pesudovs K: **Orbscan mapping in Ehlers-Danlos syndrome.** *J Cataract Refract Surg* 2004, **30**(8):1795-1798.
3. Villani E, Garoli E, Bassotti A, Magnani F, Tresoldi L, Nucci P, Ratiglia R: **The cornea in classic type Ehlers-Danlos syndrome: macro- and microstructural changes.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013, **54**(13):8062-8068.
4. Espana EM, Birk DE: **Composition, structure and function of the corneal stroma.** *Exp Eye Res* 2020, **198**:108137.
5. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Linsenmayer TF: **Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma.** *J Cell Biol* 1988, **106**(3):999-1008.
6. Birk DE, Fitch JM, Linsenmayer TF: **Organization of collagen types I and V in the embryonic chicken cornea.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986, **27**(10):1470-1477.
7. Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Doane KJ, Linsenmayer TF: **Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter.** *Journal of cell science* 1990, **95** (Pt 4):649-657.
8. Rachapudi SS, Laylani NA, Davila-Siliezar PA, Lee AG: **Neuro-ophthalmic manifestations of Ehlers-Danlos syndrome.** *Curr Opin Ophthalmol* 2023, **34**(6):476-480.
9. Malfait F, Symoens S, Syx D: **Classic Ehlers-Danlos Syndrome.** In: *GeneReviews((R))*. edn. Edited by Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A. Seattle (WA); 1993.
10. Malfait F, Francomano C, Byers P, Belmont J, Berglund B, Black J, Bloom L, Bowen JM, Brady AF, Burrows NP *et al*: **The 2017 international classification of the Ehlers-Danlos syndromes.** *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2017, **175**(1):8-26.
11. Perez-Roustit S, Nguyen DT, Xerri O, Robert MP, De Vergnes N, Mincheva Z, Benistan K, Bremond-Gignac D: **[Ocular manifestations in Ehlers-Danlos Syndromes: Clinical study of 21 patients].** *J Fr Ophtalmol* 2019, **42**(7):722-729.
12. Kling S: **Optical coherence elastography by ambient pressure modulation for high-resolution strain mapping applied to patterned cross-linking.** *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 2020, **17**(162):20190786.
13. Chung CW, Girard MJ, Jan NJ, Sigal IA: **Use and Misuse of Laplace's Law in Ophthalmology.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016, **57**(1):236-245.
14. Hammer A, Kling S, Boldi MO, Richoz O, Tabibian D, Randleman JB, Hafezi F: **Establishing Corneal Cross-Linking With Riboflavin and UV-A in the Mouse Cornea In Vivo: Biomechanical Analysis.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015, **56**(11):6581-6590.
15. Cameron JA: **Corneal abnormalities in Ehlers-Danlos syndrome type VI.** *Cornea* 1993, **12**(1):54-59.
16. Macsai MS, Lemley HL, Schwartz T: **Management of oculus fragilis in Ehlers-Danlos type VI.** *Cornea* 2000, **19**(1):104-107.
17. Borck G, Beighton P, Wilhelm C, Kohlhase J, Kubisch C: **Arterial rupture in classic Ehlers-Danlos syndrome with COL5A1 mutation.** *Am J Med Genet A* 2010, **152A**(8):2090-2093.

7. Figures

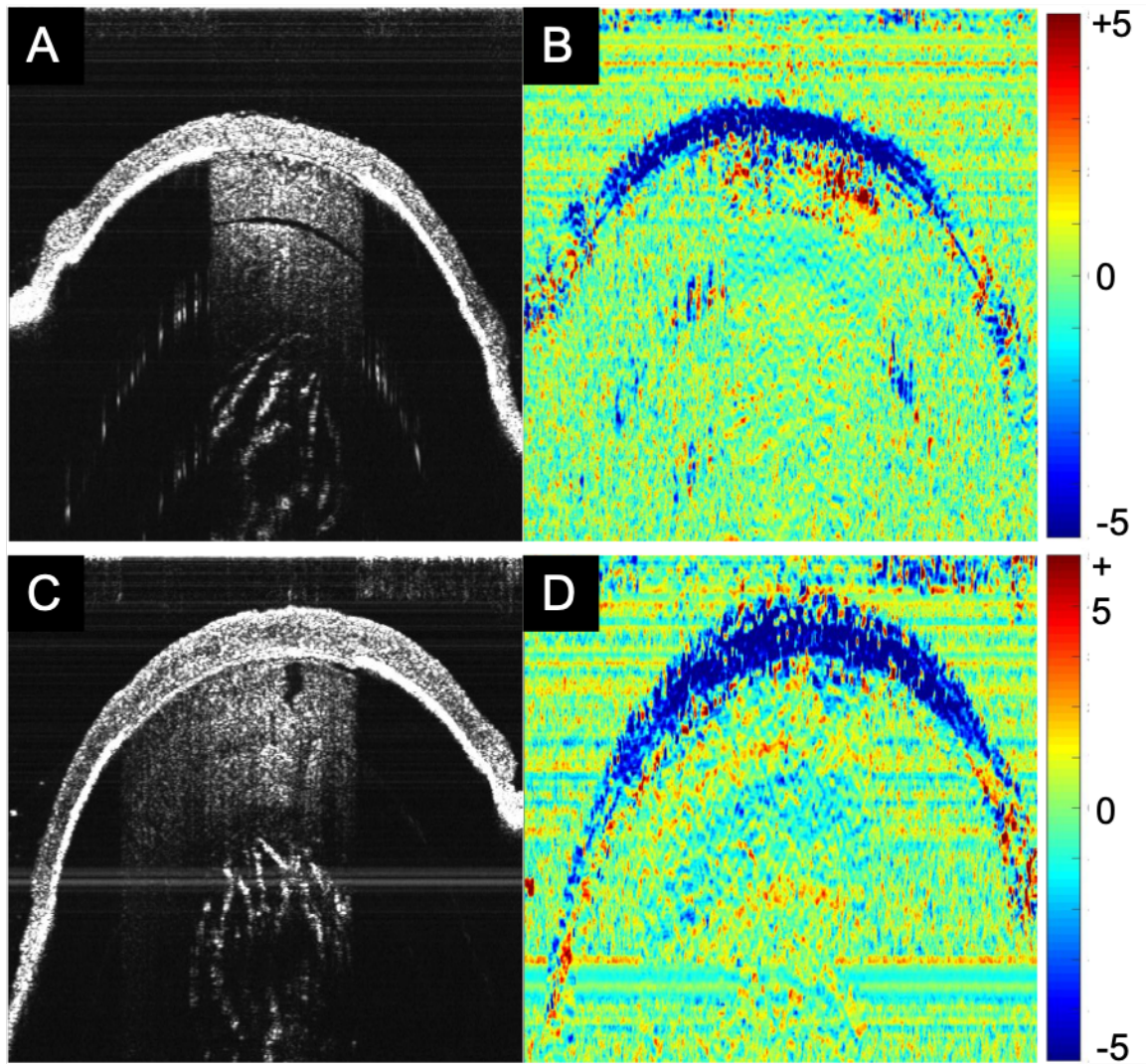


Figure 1. Image structurelle (A, C) et carte de déformation (B, D) obtenues par OCT. Les yeux *col5A1het* (A, B) avaient une épaisseur de cornée plus fine que les yeux de type sauvage (C, D), mais une distribution de déformation axiale similaire.

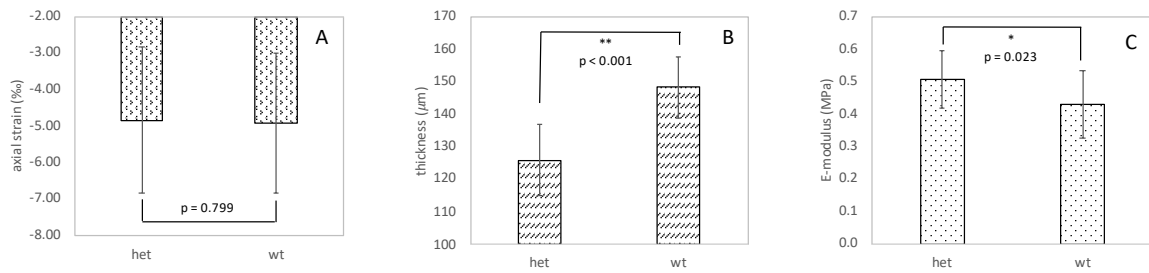


Figure 2 : (A) Déformation axiale moyenne de la cornée, (B) épaisseur centrale de la cornée et (C) module E obtenu par OCE dans les yeux *col5A1het* (*het*) et les yeux de type sauvage (*wt*). * indique une signification statistique à $p < 0,05$, ** indique une signification statistique à $p < 0,001$.

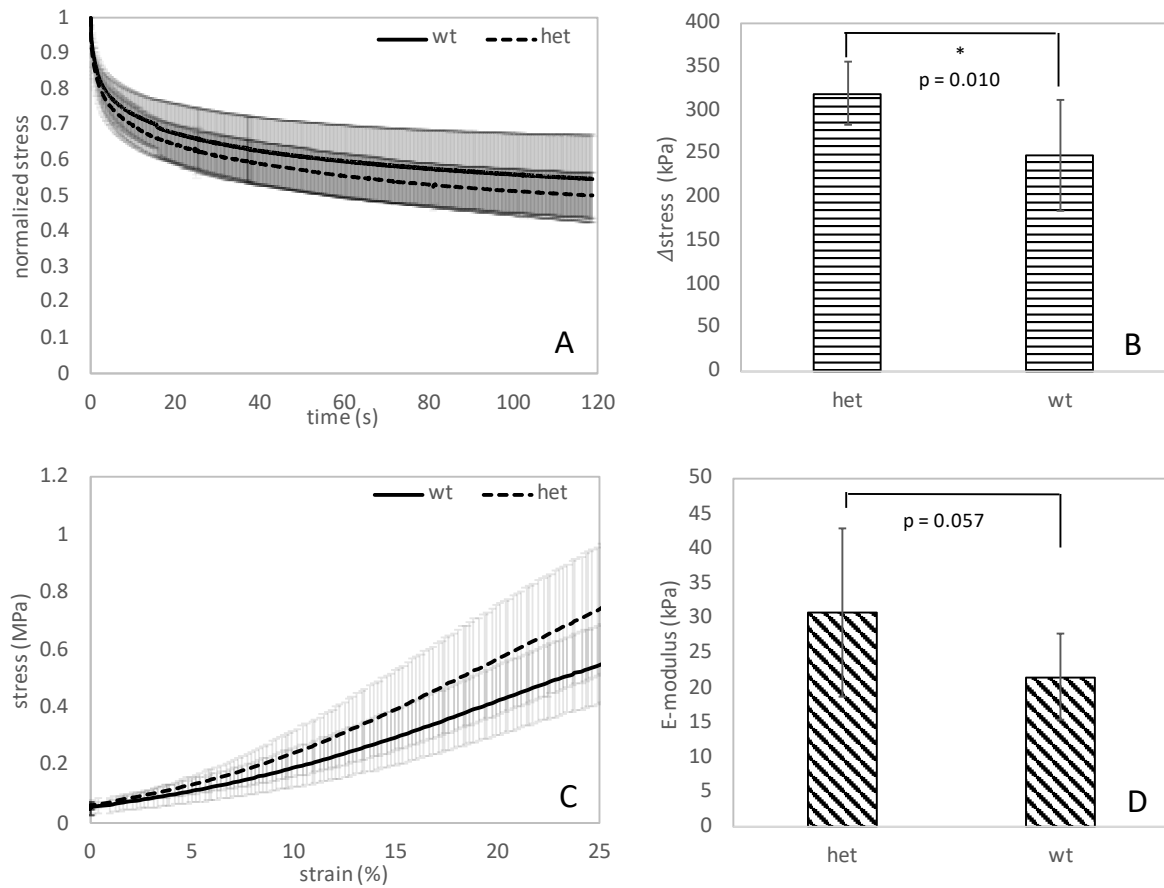


Figure 3 : (A) Courbe contrainte-relaxation, (B) Réduction absolue de la contrainte après relaxation, (C) Courbe contrainte-déformation et (D) Module E moyen entre 10 et 15% de la contrainte pour les cornées de type sauvage (*wt*) et *col5A1het* (*het*). ** indique une signification statistique à $p < 0,001$.

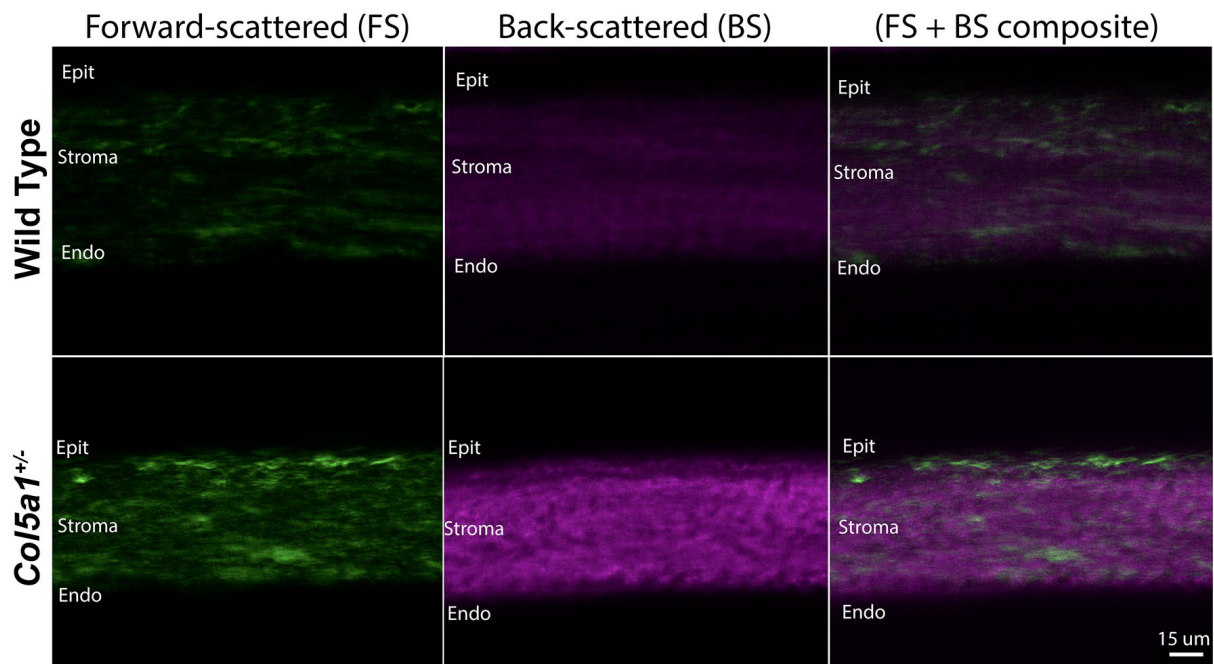


Figure 4. Images en coupe SHG des cornées obtenues immédiatement après l'énucléation et sans fixation ou manipulation tissulaire. Un signal plus faible dispersé vers l'avant et dispersé vers l'arrière est observé dans les cornées wt. Images représentatives des cornées Col5a1^{+/-} (n = 6) et wt (n = 6).

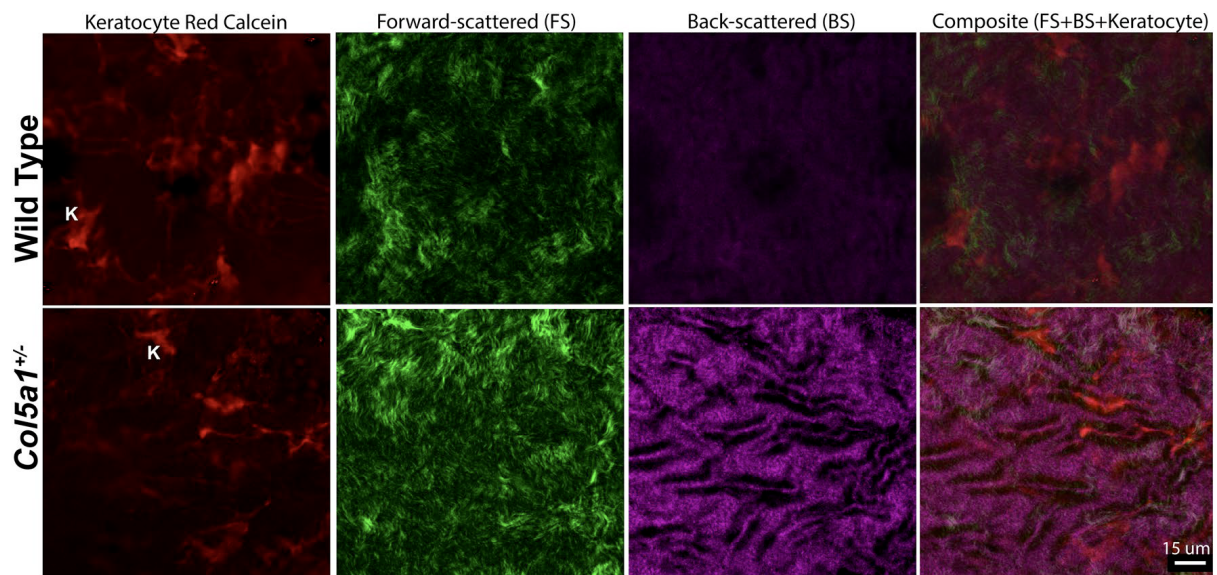


Figure 5. Images SHG en face obtenues après que les cornées ont été disséquées du globe immédiatement après l'énucléation et imagées. Les kératocytes (K) sont indiqués en rouge, car le colorant de cellules vivantes Calcein AM pénètre la membrane cellulaire des kératocytes vivants. Remarquez les différences de forme des kératocytes dans les cornées Col5a1+/- par rapport à wt et l'augmentation des plis stromaux observée dans les cornées Col5a1+/- obtenues avec un signal rétrodiffusé. Images représentatives des cornées Col5a1+/- (n = 6) et wt (n = 6).

8. Rapport du directeur de thèse

Chères et chers collègues,

Je suis honoré de vous présenter un rapport détaillé sur la contribution de Monsieur Torres-Netto à sa thèse de doctorat dans le domaine de l'ophtalmologie.

Contribution de Monsieur Torres-Netto au travail : " L'insuffisance de collagène V dans un modèle murin du syndrome d'Ehlers Danlos affecte les propriétés biomécaniques viscoélastiques expliquant les cornées fines et fragiles "

Monsieur Torres-Netto a apporté une contribution impressionnante et exhaustive à sa thèse de doctorat, couvrant toutes les phases du processus de recherche. Ses efforts dévoués et ses compétences sont évidents à toutes les étapes du projet. Cela a été démontré de manière constante au cours des dernières années, notamment par sa vaste liste d'articles publiés, qui, grâce à ce succès, est devenu une référence internationale dans son domaine d'activité.

Ci-dessous, les étapes du projet sont décrites :

- Planification et conception expérimentale : La planification de l'expérience a bénéficié grandement de la contribution cruciale de Monsieur Torres-Netto, qui a développé une conception expérimentale méticuleuse et a démontré sa capacité à élaborer et mettre en œuvre des protocoles expérimentaux complexes, améliorant ainsi la qualité du travail.
- Réalisation des expériences : Monsieur Torres-Netto a réalisé les expériences de manière individuelle, avec sa collègue le Dr Sabine Kling, également premier auteur de cette étude. Son expérience préalable en tant que chirurgien ainsi que la capacité translationnelle de ses recherches précédentes ont été des éléments clés dans ce projet.
- Collecte et analyse des données : Monsieur Torres-Netto était chargé de réaliser les expériences avec sa collègue, et tout le processus s'est déroulé méticuleusement, supervisé à tout moment par moi-même. Son expertise en biomécanique et ses compétences en matière d'analyse des données ont permis de tirer des conclusions claires et fondées des résultats.

- Rédaction du manuscrit : Monsieur Torres-Netto a rédigé lui-même une grande partie du manuscrit de la thèse. Il fait preuve non seulement d'une remarquable capacité à écrire scientifiquement, mais aussi à rendre compréhensibles des concepts scientifiques assez complexes impliquant la médecine translationnelle. La qualité du manuscrit reflète son engagement en faveur de l'excellence dans la communication scientifique.
- Encadrement de la recherche et travail d'équipe : Pendant de nombreuses années, M. Torres-Netto a apporté des idées originales, a participé activement aux discussions et aussi à la prise de décisions. Le résultat de cette publication le reflète entièrement. Il n'en a pas été autrement dans ce travail, et sa volonté de partager ses connaissances et de collaborer avec les autres a été un facteur clé de la réussite du projet. De plus, il a un sens du travail d'équipe sans égal, écoutant toujours ses collègues tout en exprimant son point de vue avec respect.

Le travail de M. Torres-Netto a déjà été publié dans la revue **Nature Scientific Reports**.

<https://www.nature.com/articles/s41598-021-96775-w>

En somme, le brillant parcours de M. Torres-Netto transcende largement sa contribution substantielle au corpus des connaissances scientifiques inscrite dans cette thèse. Il incarne véritablement l'excellence du chercheur indépendant, déployant un dévouement sans faille, une précision chirurgicale et une aptitude remarquable à surmonter les défis scientifiques les plus ardues. Ces qualités remarquables méritent une reconnaissance sans équivoque, témoignant de son engagement inébranlable envers l'avancement de la science.



Farhad Hafezi

Prof. Dr. Dr. méd.

Université de Genève