Bull. Acad. Natle Méd., 2013, *197*, nº 7, 1319-1328, séance du 8 octobre 2013

COMMUNICATION

Les chimiokines : une nouvelle piste thérapeutique dans le glaucome et les maladies inflammatoires de la surface oculaire

Mots-clés : Chimiokines. Chimiokine CXCL12. Récepteurs CXCR4. Récepteurs CXCR3. Glaucome. Inflammation. Composés de benzalkonium

Chemokines: new insights in the treatment of glaucoma and inflammatory diseases of the ocular surface

Key-words (Index medicus): Chemokines. Chemokine CXCL12. Receptors, CXCR4. Receptors, CXCR3. Glaucoma. Inflammation. Benzalkonium Compounds

William ROSTENE *, Alexandre DENOYER * et Christophe BAUDOUIN *

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêt en relation avec le contenu de cet article

RÉSUMÉ

Les commémorations du bicentenaire de la naissance de Claude Bernard (1873-1878) sont l'occasion de rappeler tous les travaux pionniers réalisés par ce grand physiologiste et qui restent d'une grande actualité scientifique et médicale. Bien que Claude Bernard n'ait pas directement travaillé sur les fonctions visuelles, de nombreux concepts, en particulier que nos tissus baignent dans un liquide nourricier permettant ainsi la fixité du milieu intérieur, sont parfaitement illustrés dans la pathologie du glaucome.

Deuxième cause de cécité dans le monde, le glaucome, ou plutôt les glaucomes, constituent des enjeux essentiels tant en matière de santé publique que de recherche biomédicale. Ces pathologies ont bénéficié de progrès technologiques très importants dans les deux dernières décennies, au niveau du diagnostic, de la connaissance de la physiopathologie ou du traitement, mais il reste encore beaucoup à faire. Le glaucome est une neuropathie optique,

* Institut de la Vision UMRS 968 INSERM-UPMC-CNRS ; Paris ; Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts ; Université de Versailles-St Quentin en Yvelines — Versailles, France

Tirés à part : Dr William Rostene, Institut de la Vision UMRS 968, 17 Rue Moreau — 75012 Paris ; e-mail : William.rostene@inserm.fr
Article reçu le 2 décembre 2013.

essentiellement quoique non exclusivement, liée à une hyperpression oculaire principalement due à une dysfonction du filtre trabéculaire. Les traitements médicaux sont la première ligne thérapeutique, avant les lasers ou la chirurgie. Leur administration au long cours peut cependant entrainer des dommages pour la surface oculaire, notamment des phénomènes inflammatoires liés aux conservateurs des collyres, tel le chlorure de benzalkonium. De nouvelles données faisant intervenir les chimiokines, molécules impliquées dans l'inflammation, et tout particulièrement le CXCL12 au niveau du trabéculum, offrent de nouvelles voies thérapeutiques prometteuses.

SUMMARY

The celebrations of the 200th anniversary of Claude Bernard's birth (1813) give us the opportunity to recall all the pioneer work carried out by the great physiologist, which still remains relevant in both scientific and medical fields. The description that tissues are "floating in a liquid milieu" bringing survival molecules and allowing homeostasis, is particularly illustrated in the physiopathology of glaucoma.

Second leading cause of blindness worldwide, glaucoma is an optic neuropathy mainly related to an increase of intraocular pressure. Degeneration of the trabecular meshwork, the filter that allows aqueous humor outflow from the eye, includes loss of trabecular cells, extracellular matrix remodeling, oxidative stress, and release of inflammatory cytokines, which are together the hallmarks of glaucoma. Although globally efficient, the topical treatments of glaucoma with eye drops containing active compounds produce, in the long-term, side effects mainly due to benzalkonium chloride, a preservative added to prevent bottle contamination. Such compound induces inflammatory processes. Thus, new data involving chemokines such as CXCL12, known to play a key role in inflammation and cellular crosstalk in the trabecular meshwork, offer new targets for the development of innovative treatments in glaucoma.

INTRODUCTION

Bien que n'ayant pas directement travaillé sur les fonctions visuelles, Claude Bernard a bien compris les liens qui pouvaient exister entre la vision et les fonctions essentielles de notre organisme. Dans le concept essentiel de « la fixité du milieu intérieur » qu'il a développé au cours de ces années d'observation, Claude Bernard suggérait que nos organes baignaient dans un milieu liquide et que ce dernier devait fournir énergie et nourriture. Il a aussi démontré que nous avions en interne des systèmes de régulation dont on sait maintenant que les horloges biologiques et les mécanismes de rétroaction font partie. Dans un tel contexte, l'œil, par la régulation des liquides comme l'humeur aqueuse, est un bon exemple de cette « fixité du milieu intérieur ». Comme le montre la figure 1 tirée d'un de ses multiples cahiers d'expériences, il a dessiné d'une manière parfaitement exacte à la fois l'innervation nerveuse et vasculaire qui permet le fonctionnement de l'œil.

C'est la compréhension des interactions entre l'œil et son environnement qui est à la base des avancées extraordinaires réalisées au cours des deux dernières décennies

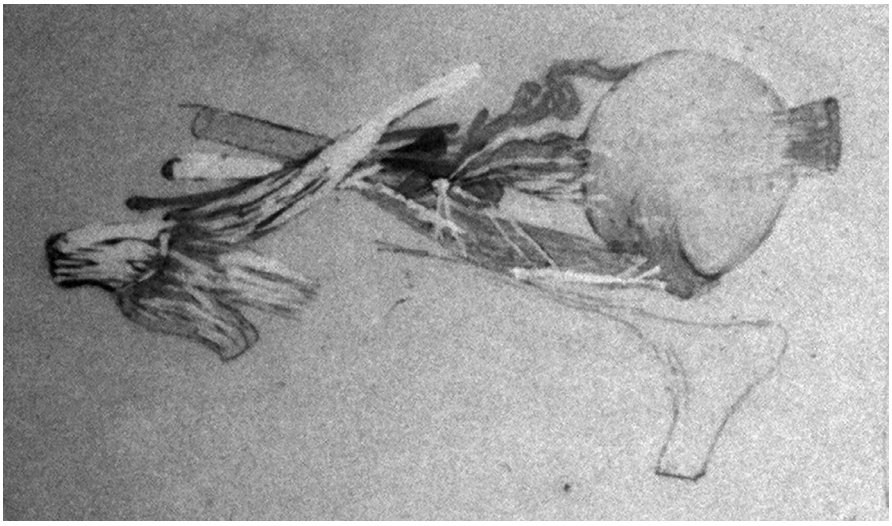

Fig. 1. — Schéma dessiné par Claude Bernard (1813-1878) dans un de ses cahiers d'expériences où l'on voit l'œil, ses projections nerveuses et sa vascularisation.

dans le traitement de certaines maladies visuelles telles que le glaucome ou les atteintes de la partie antérieure de l'œil, la surface oculaire. Citons Claude Bernard dans les messages donnés dans son ouvrage majeur, l'introduction à l'étude de la médecine expérimentale [1] :

— Il existe une continuité entre le normal et le pathologique ;
— La pathologie animale, surtout lorsqu'elle est créée, instruit sur la pathologie humaine ;
— La médecine ne se finit pas à l'hôpital. Après avoir émis des hypothèses, il faut les contrôler au laboratoire.

Nous avons ainsi suivi ces préceptes en partant d'observations cliniques, afin de mieux étudier, en lien entre l'institut de la vision et le centre hospitalier des Quinze-Vingts à Paris, la pathologie du glaucome et rechercher des pistes pour des traitements nouveaux de cette pathologie oculaire invalidante.

LES GLAUCOMES

Le glaucome est une des plus fréquentes et plus sévères maladies de l'œil. Deuxième cause de cécité dans le monde, il touche environ soixante millions de personnes dont 6 à 7 millions sont aveugles [2]. On considère qu'environ 900 000 personnes sont traitées en France pour un glaucome mais que 4 à 500 000 autres présentent cette maladie sans le savoir. Le glaucome est en effet une maladie sournoise que l'on ne

ressent généralement pas car elle n'est pas douloureuse, et que l'atteinte visuelle commence par les côtés puis s'approche du centre et ce n'est que dans les formes tardives déjà très sévères que l'on se rend compte d'un déficit visuel menaçant. En revanche, la perte de vision est définitive et lorsque la vision centrale finit par être atteinte, le handicap visuel est majeur et irréversible.

Il existe deux grandes familles de glaucome, en fonction de l'anatomie de l'œil, en particulier de l'angle irido-cornéen, structure formée par la cornée en avant, l'iris en arrière, et au fond de laquelle se situe le trabéculum, filtre d'évacuation des liquides, principalement l'humeur aqueuse.

Lorsque c'est la structure anatomique, l'angle irido-cornéen, qui est anormalement serrée, l'accès de l'humeur aqueuse au filtre trabéculaire peut être difficile voire bloqué. Ce phénomène est particulièrement marqué la nuit lorsque la pupille se dilate dans l'obscurité : l'iris avance et peut entrer en contact avec la cornée, bloquant ainsi l'accès des liquides oculaires au trabéculum. L'humeur aqueuse ne peut plus sortir, la pression monte, c'est le glaucome par fermeture de l'angle. Celui-ci peut se manifester brutalement par de grandes crises nocturnes, douloureuses, spectaculaires, très destructrices, nécessitant un traitement en urgence, mais parfois des crises moins violentes, entraînant peu ou pas de douleur, détruisant le nerf optique sans que l'on s'en aperçoive, de manière rapide et irréversible. Ces glaucomes sont particulièrement agressifs et, s'ils ne sont pas détectés à temps, sources de cécité ou de malvoyance définitive alors que leur traitement préventif ou curatif est relativement simple.

Lorsque la structure anatomique est normale mais que le filtre, le trabéculum, est altéré, on parle d'un glaucome à angle ouvert. Ce glaucome chronique le plus commun, est une neuropathie optique généralement associée à une élévation pathologique de la pression intraoculaire, premier facteur de risque de la neuropathie. Cette neuropathie est caractérisée par une dégénérescence progressive des cellules ganglionnaires de la rétine, et donc du nerf optique, pouvant conduire à la cécité. Les altérations trabéculaires glaucomateuses ressemblent à une dégénérescence associant un remaniement de la matrice extracellulaire à une raréfaction des cellules trabéculaires qui meurent essentiellement par apoptose. Aujourd'hui encore, les mécanismes pathogéniques impliqués dans cette trabéculopathie demeurent mal compris. Les traitements actuels contre le glaucome visent à diminuer la pression oculaire, mais ne ciblent pas directement le trabéculum et sa dégénérescence, ce qui pourrait expliquer pour une part les échecs thérapeutiques parfois rencontrés dans la pratique clinique.

LES TRAITEMENTS ACTUELS

Alors que le glaucome à angle fermé se traite essentiellement par laser ou chirurgie, le glaucome chronique à angle ouvert relève le plus souvent d'un traitement médical. En effet, la pression est modérément élevée et un arsenal thérapeutique de plus en

plus riche a été développé pour la faire baisser, permettant de ralentir ou de bloquer l'atteinte du nerf optique. Pendant près d'un siècle, les familles thérapeutiques étaient extrêmement réduites, les traitements d'efficacité moyenne et de tolérance médiocre. Pilocarpine, dérivés d'adrénaline, bêtabloquants, jusqu'au milieu des années 90 étaient les seuls traitements médicaux du glaucome. Depuis une quinzaine d'années sont apparues de nombreuses nouvelles molécules qui ont augmenté l'efficacité du traitement médical du glaucome, en particulier une véritable révolution pharmacologique marquée par l'arrivée de la première prostaglandine à usage ophtalmologique en 1996. Les prostaglandines ou analogues des prostaglandines, par leur efficacité et leur très bonne tolérance globale, sont devenues en quelques années la classe thérapeutique utilisée en première intention dans le traitement du glaucome. Les bêtabloquants sont également très largement utilisés, seuls ou en association avec une prostaglandine dont les actions pharmacologiques sont très complémentaires. Le début des années 2000 a été marqué par l'apparition d'un concept nouveau, celui des associations fixes permettant dans le même collyre de mêler deux molécules actives. Ces associations ont le mérite de faciliter la vie des patients, donc d'améliorer l'observance, en diminuant le nombre d'instillations quotidiennes, mais également d'améliorer la tolérance locale car les gouttes, en contre partie de leur efficacité, restent malgré tout relativement irritantes pour les yeux qui les reçoivent pendant des dizaines d'années.

TOXICITÉ DES CONSERVATEURS ET IMMUNOLOGIE DE LA SURFACE OCULAIRE

L'enjeu de la tolérance est donc devenu, après celui de l'efficacité, la principale cible de l'industrie pharmaceutique et des spécialistes du glaucome. En particulier, la découverte que le conservateur des collyres, le chlorure de benzalkonium (BAC), pouvait créer des irritations parfois difficilement supportables (sécheresse oculaire, réactions allergiques, inflammation des paupières, larmoiement, etc.) a conduit progressivement l'industrie pharmaceutique à reconsidérer de nouveaux collyres dépourvus de ce conservateur en développant des formulations en uni-doses ou de nouveaux flacons filtrant le conservateur.

Le BAC est un ammonium quaternaire dont les propriétés bénéfiques bactéricides sont hélas associées à des effets délétères toxiques et pro-inflammatoires sur la surface oculaire. Depuis une quinzaine d'années environ, les travaux de notre équipe ont démontré chez l'animal et chez l'homme, les effets délétères d'une exposition chronique aux collyres conservés avec du BAC : destruction du film lacrymal, destruction de l'épithélium cornéen et conjonctival par apoptose et inflammation de la surface oculaire [3]. Notre équipe a ainsi démontré de façon originale que les cellules épithéliales conjonctivales au cours de la sécheresse oculaire ou bien exposées au BAC se mettaient à exprimer des antigènes de classe II HLA-DR, identifiés et quantifiés en clinique par empreintes conjonctivales et immuno-

cytométrie, constituant aujourd'hui le marqueur de référence dans l'évaluation de l'inflammation de la surface oculaire. Récemment, nous avons rapporté que l'effet pro-inflammatoire du BAC était en partie médié par la chimiokine CX3CL1, aussi appelée fractalkine, dont la surexpression épithéliale induite par le BAC était responsable d'une migration de cellules inflammatoires — essentiellement de populations monocytaires/macrophagiques vers la conjonctive [4].

L'ensemble de ces phénomènes toxiques et inflammatoires est d'autant plus intéressant dans le glaucome que la surface oculaire et le trabéculum constituent des structures anatomiquement très proches. Aujourd'hui, de nombreux travaux se focalisent sur leurs interrelations, que ce soit sur le versant d'une toxicité directe du BAC qui pourrait pénétrer en profondeur dans les tissus jusqu'au trabéculum [5], ou bien sur la propagation de l'inflammation de la surface vers la profondeur par l'intermédiaire de cellules et/ou de médiateurs inflammatoires.

DE NOUVELLES CIBLES THÉRAPEUTIQUES : LES CHIMIOKINES ?

Quand on parle de médiateurs inflammatoires, on pense aux cytokines et plus particulièrement à une famille de cytokines que sont les chimiokines.

Les chimiokines sont des cytokines de faible poids moléculaire qui se lient à des récepteurs couplés aux protéines G. Elles jouent un rôle immunologique fondamental dans le chimiotactisme des leucocytes, mais présentent aussi des fonctions extra-immunitaires en régulant la communication intercellulaire, la viabilité cellulaire, ainsi que la composition de la matrice extracellulaire [6]. La chimiokine CXCL12 joue un rôle spécifique dans le maintien de l'homéostasie des niches de cellules souches, dans la régulation de la matrice et dans la migration, l'implantation et la survie des cellules cancéreuses via son principal récepteur CXCR4 [7]. Récemment, il a été démontré sur des cellules nerveuses humaines que le clivage de CXCL12 par des métalloprotéinases en une forme tronquée nommée SDF-1(5-67) était responsable de la mort cellulaire par l'intermédiaire d'un autre récepteur, CXCR3 [8]. Ainsi l'environnement extracellulaire, comme la composition de la matrice extracellulaire ou la présence de médiateurs de l'inflammation et de protéinases, pourrait conditionner la fonction de CXCL12 en modifiant son affinité pour certains récepteurs et donc sa fonction.

Les altérations trabéculaires constatées au cours du glaucome (apoptose, inflammation et remaniement de la matrice) nous ont amenés à formuler l'hypothèse selon laquelle CXCL12, sa forme tronquée SDF-1(5-67), et leurs récepteurs pourraient être impliqués dans la trabéculopathie glaucomateuse.

La chimiokine CXCL12 et les récepteurs CXCR3 et CXCR4 ont été identifiés au sein de trabéculums de patients glaucomateux et sur une lignée cellulaire humaine de trabéculum. Les cellules trabéculaires produisent CXCL12 et SDF-1(5-67) sous le contrôle de métalloprotéinases et de cytokines connues comme étant impliquées

dans le glaucome, notamment le TGFbêta-2. Il existe ainsi un équilibre entre la chimiokine CXCL12 qui favorise la viabilité cellulaire via CXCR4 et sa forme tronquée SDF-1(5-67) qui se lie à CXCR3 et potentialise l'apoptose due au BAC (Figure 2). L'utilisation *in vivo* d'un antagoniste non peptidique spécifique de CXCR3 chez le rat glaucomateux a permis de diminuer l'hypertonie oculaire en restaurant la fonction trabéculaire, d'inhiber la dégénérescence neurorétinienne et de protéger ainsi la fonction visuelle (Figure 3).

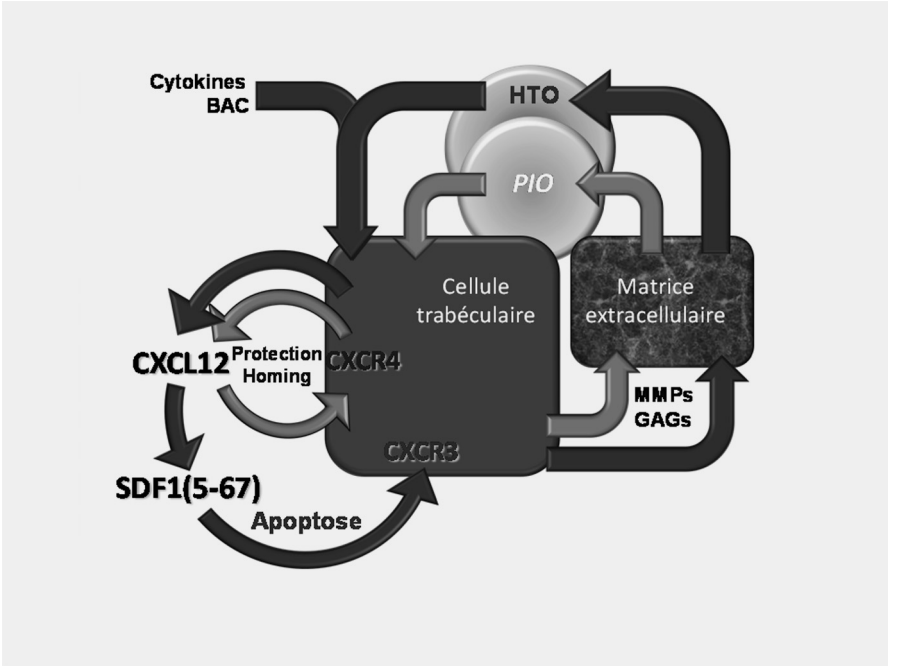

Fig. 2. — Implication de CXCR3 et CXCR4 dans la trabéculopathie glaucomateuse. Sous l'action de cytokines pro-inflammatoires (TNF, TGF...) ou du chlorure de benzalkonium (BAC), la cellule trabéculaire peut fabriquer la chimiokine CXCL12 qui joue, par un effet autocrine, un rôle protecteur via son récepteur CXCR4. Cependant, si la stimulation toxique est trop intense ou répétée dans le temps, le CXCL12 peut être tronqué en une forme toxique, le SDF1 (5-67) sous l'action des métalloprotéinases (MMPs). Le SDF1 (5-67) peut induire une destruction du trabéculum provoquant une augmentation de la pression intraoculaire (PIO) et donc une hypertension oculaire (HTO).

Ces travaux ont démontré de façon originale qu'un système chimiokinergique pourrait être impliqué dans le contrôle de la fonction et de la viabilité trabéculaires, et que l'utilisation d'un antagoniste spécifique d'un récepteur aux chimiokines, CXCR3, permettrait de traiter l'élévation pathologique de la pression intraoculaire et la neuropathie associée dans un modèle animal d'hypertonie oculaire [9]. Ces résultats ouvrent naturellement de nouvelles pistes thérapeutiques qui cibleraient de

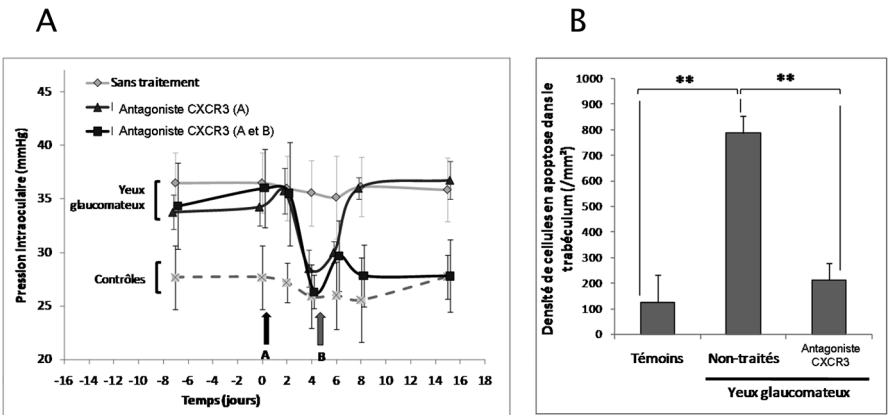

FIG. 3. — L'administration oculaire d'un antagoniste de CXCR3 diminue la pression intraoculaire dans un modèle animal d'hypertension oculaire (n=10 dans chaque groupe) (A), et inhibe la dégénérescence apoptotique des cellules trabéculaires, montrée par la technique du Tunel, permettant la protection des cellules ganglionnaires de la rétine (B). Adapté de Denoyer *et al*. [9]

façon sélective certains récepteurs aux chimiokines au cours du glaucome. Il pourrait être possible par cette stratégie non seulement de diminuer la pression oculaire, mais aussi de ralentir l'évolution voire prévenir la trabéculopathie elle-même, *primum movens* de la maladie glaucomateuse, et ainsi protéger la fonction visuelle des patients.

CONCLUSION

De nombreux travaux sont encore nécessaires en recherche fondamentale pour mieux appréhender les mécanismes de régulation physiologique et pathologique de ces maladies oculaires. Les travaux résumés ci-dessus mettent à jour la complexité des systèmes de communications intercellulaires impliqués *via* certains axes chimiokinergiques. Ils révèlent en outre certains obstacles plus pratiques comme l'absence de modèles animaux satisfaisants et l'inadéquation anatomique et fonctionnelle entre l'œil humain et celui des différentes espèces animales. Sur le plan clinique, il semble crucial d'identifier des acteurs biologiques ou cellulaires spécifiques, d'une part pour essayer de développer de nouvelles voies thérapeutiques ciblées, et d'autre part, pour développer de nouveaux biomarqueurs pertinents aujourd'hui indispensables à la conduite d'études cliniques multicentriques pour l'évaluation de la sévérité de ces affections comme de l'efficacité potentielle des futurs traitements.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Bernard C. — Introduction à l'étude de la médecine expérimentale, J.B. Baillière et fils, Edit., Paris, 1865.

[2] Quigley H.A., Broman A.T. — The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br. J. Ophthalmol.*, 2006, *90*, 262-267.

[3] Baudouin C., Labbe A., Liang H. *et al.* — Preservatives in eyedrops : the good, the bad and the ugly. *Prog. Retin. Eye Res.*, 2010, *29*, 331-334.

[4] Denoyer A., Godefroy D., Celerier I., *et al.* — CX3CL1 expression in the conjunctiva is involved in immune cell trafficking during toxic ocular surface inflammation. *Mucosal. Immunol.,* 2012, *5*,702-711.

[5] Brignole-Baudouin F., Desbenoit N., Hamm G. *et al.* — A new safety concern for glaucoma treatment demonstrated by mass spectrometry imaging of benzalkonium chloride distribution in the eye. An experimental study in rabbits. *PLoS One*, 2012, *7(11),* e50180.

[6] Rostene W., Dansereau M.A., Godefroy D. *et al.* — Neurochemokines: a menage à trois providing new insights on the functions of chemokines in the central nervous system. *J. Neurochem.*, 2011, *118*, 680-694.

[7] Singh A.K., Arya R.K., Trivedi A.K. *et al.* — Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2012, doi:pii: S1359-6101(12)00071-8.

[8] Vergote D., Butler G.S., Ooms M. *et al.* — Proteolytic processing of SDF-1a reveals a change in receptor specificity mediating HIV-associated neurodegeneration. *PNAS*, 2006, *103*, 1982-1987.

[9] Denoyer A., Godefroy D., Celerier I. et *al.* — CXCR3 antagonism of SDF-1(5-67) restores trabecular function and prevents retinal neurodegeneration in a rat model of ocular hypertension. *PLoS One*, 2012, *7(6),* e37873.

DISCUSSION

M. François-Bernard MICHEL

Avez-vous une explication au fait que se produit particulièrement une telle condensation locale de chimiokines à partir des lymphocytes oculaires ?

La majorité des pathologies oculaires présente une composante inflammatoire. Si cette inflammation est clairement établie pour les conjonctivites ou les uvéites par exemple, il existe de même une inflammation, mais à un niveau plus bas, pour ce qui est du glaucome. Les chimiokines sont les molécules impliquées en cas d'infection ou d'inflammation. Leur rôle principal est d'attirer les cellules du système immunitaire, les lymphocytes, vers ces sites inflammatoires. Ce phénomène se réalise grâce à un gradient de concentration de chimiokines fabriquées par les cellules inflammatoires attirant les lymphocytes porteurs des récepteurs de ces chimiokines. Une importante littérature existe sur ce phénomène d'attraction en immunologie.

Mme Monique ADOLPHE

Pouvez-vous me donner quelques précisions sur les lignées trabéculaires dont vous nous avez parlé ?

Nous avons la chance de posséder des lignées cellulaires humaines de trabéculum, structure de la chambre antérieure de l'œil impliquée dans l'évacuation de l'humeur aqueuse. Le trabéculum joue un rôle de filtre dont on sait que la fonction est perturbée en cas de glaucome primitif à angle ouvert. Les lignées les plus utilisées sont des cellules trabéculaires humaines transfectées afin d'être immortalisées, comme les HTM provenant originellement de patients glaucomateux ou témoins (Alcon) (Référence Pang I.H. *et al.*, *Current Eye Res.*, 1994, *13*, 51-63). Le point négatif de ces cellules, valable pour toutes ces lignées cellulaires, est le fait qu'elles peuvent dériver et perdre les caractéristiques des cellules trabéculaires d'origine. Dans notre laboratoire, nous sommes d'ailleurs passés à d'autres cellules telles que des cellules primaires humaines de trabéculum provenant d'un sujet non glaucomateux et qui présentent un phénotype fibroblastique typique de ce filtre.

M. Jean-Louis DUFIER

Je voudrais revenir sur le rôle du benzalkonium, qui n'a pas de vocation à faciliter la pénétration oculaire des molécules à visée thérapeutique, mais à assurer l'antisepsie du contenu des flacons de collyre. Sa mauvaise tolérance, responsable de la toxicité des collyres, a conduit à utiliser des collyres sans conservateur, conditionnés dans des capsules « unidose » à usage unique.

Nous sommes tout-à-fait d'accord là-dessus, le chlorure de benzalkonium a bien un rôle antiseptique permettant l'utilisation répétée des flacons contenant des collyres. Cependant, outre sa mauvaise tolérance, l'aspect essentiel bien décrit dans l'article de revue de Baudouin C. *et al.,* 2010 (référence 3 de l'article) démontre que cet ammonium quaternaire peut avoir à long terme des effets délétères, en particulier inflammatoires. De ce fait, il modifie la barrière permettant le privilège immunologique de l'œil, et ainsi la pénétration de certaines substances dont celles présentes dans les collyres.