



HAL
open science

Etude de la toxicité et des mécanismes de mort cellulaire induits par les glucocorticoïdes sur les cellules endothéliales

Ikram El-Zaoui

► **To cite this version:**

Ikram El-Zaoui. Etude de la toxicité et des mécanismes de mort cellulaire induits par les glucocorticoïdes sur les cellules endothéliales. Toxicologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05P640 . tel-01470298

HAL Id: tel-01470298

<https://theses.hal.science/tel-01470298>

Submitted on 17 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Spécialité : Toxicologie des Médicaments et Biologie Cellulaire

École doctorale : « ED 436 Médicament, Toxicologie, Chimie,
Environnement »

réalisée à

INSERM U872 Equipe 17 : Physiopathologie des maladies
oculaires : innovations thérapeutiques

présentée par

Ikram El-Zaoui

pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS DESCARTES

Sujet de la thèse :

**Étude de la toxicité et des mécanismes de mort
cellulaires induits par les glucocorticoïdes sur les
cellules endothéliales**

Soutenue le 23 Octobre 2013

devant le jury composé de :

Dr. J. C. JEANNY
Dr. A. BOCHOT
Pr. B. MIGNOTTE
Dr. F. BAUDOUIN
Pr. E. MESSAS
Dr. S. KRANTIC
Dr. A. TORRIGLIA
Pr. F. BEHAR-COHEN

Université Paris VI
UMR CNRS 8612, Paris-11
UVSQ / EPHE Université de Versailles
INSERM UMR-S968, Université Paris V
INSERM U633, Université Paris V
INSERM U872 E.19, Université Paris VI
INSERM U872 E.17, Université Paris VII
INSERM U872 E17. Université Paris V

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Co-directeur de thèse
Directeur de thèse

Mes remerciements

Je suis reconnaissante aux Docteurs Amélie BOCHOT, Françoise BRIGNOLE-BAUDOUIN et Slavica KRANTIC ainsi qu'aux Professeurs Bernard MIGNOTTE et Emmanuel MESSAS de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner et d'évaluer ce travail de leur point de vue d'experts. Un grand merci au Docteur Jean-Claude Jeanny de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Merci beaucoup pour votre courtoisie et d'avoir répondu présent à chacune de mes sollicitations.

Je tiens à remercier le Pr Francine BEHAR-COHEN pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour la confiance qu'elle m'a toujours témoignée. Merci pour votre bonne volonté à toutes épreuves, votre dynamisme, enthousiasme et pour avoir su m'éclairer avec vos intarissables connaissances. Trouvez ici l'expression de mon grand respect.

Toute ma gratitude au Dr Alicia TORRIGLIA pour sa confiance, sa grande disponibilité et son ouverture d'esprit professionnelle et surtout humaine. Merci Alicia de m'avoir initiée au monde de *la mort cellulaire*, d'avoir encadré ce travail, encore Merci pour ton soutien et ton écoute, ta joie de vivre si contagieuse, pour les bons moments que tu as bien accepté de partager avec moi. De tout cela je garde un souvenir indélébile.

Un très grand merci à mes amies du labo, Gloria pour ta douceur apaisante et ton réconfort, Iméne pour ta bienveillance et nos plaisantes discussions à la marocaine !!, Naima (j'aurais adoré que tu sois parmi nous), Cécile pour ta bonne humeur et nos éclats de rires, Agathe pour ta compagnie tard les soirs et les weekends au labo, Marilyne ma pétillante starlette (reste comme tu es, ne change rien). Mille mercis les filles pour votre amitié, les anniversaires surprises, le soutien dans les moments durs et le partage des moments de bonheur, grâce à vous, même loin de ma famille, je ne me suis jamais sentie seule.

Je remercie profondément Elisabeth et Brigitte pour leur disponibilité, leurs qualités de correcteurs avertis. Mercis Elisabeth pour tes histoires à se plier de rire, tes fêtes de l'été et ta touche artistique et colorée sur nos présentations power point, Brigitte pour ta gentillesse et ton indétrônable gâteau au chocolat.

Je souhaiterais également remercier tous les membres de l'équipe 17 connus durant ces 4 années, seniors, docteurs et étudiants, pour m'avoir si joyeusement intégrée, particulièrement Marie Christine, Patricia pour votre amabilité et votre bonne humeur, Laura, Juliana et Marianne pour tous ce que nous avons partagé, une mention spéciale à Faty pour son aide, ses conseils et sa générosité surtout pendant mon stage de master. Un grand merci aux chercheurs pour avoir partagé leurs connaissances scientifiques et leurs expériences.

Je souhaiterais dire un énorme merci aux personnes qui m'ont entourée pendant ce parcours, tout simplement pour avoir été là, en toutes circonstances, sans leur amour, aide et soutien beaucoup de choses auraient été plus difficiles voir même impossibles, spécialement Talal, Khadidja, Samih, Sarah, Fouad, mon oncle Mohammed et Sid Ahmed.

Je dédie ce travail à ma famille à qui je dois tout, mes deux joyaux adorées Rajaa et Sihem, à Rachid et ma très chère grand-mère.

A Mes défunts grands parents

A MA MERE « Je t'aime »

الشكر الأول و الأخير لله رب العالمين

La vision est l'art de voir les choses invisibles.

Jonathan Swift (1667-1745)

Table des matières

Avant propos	12
Chapitre I : Introduction Bibliographique	14
1 Les glucocorticoïdes	14
1.1 Historique	14
1.2 Synthèse endogène des glucocorticoïdes	15
1.2.1 Origine	15
1.2.2 La stéroïdogénèse	16
1.2.2.1 La première étape, la formation de prégnénolone	17
1.2.2.2 La deuxième étape, la synthèse du cortisol	17
1.2.2.3 La troisième étape, l'obtention de la cortisone	17
1.2.3 La régulation de la cortisolémie	18
1.3 La relation structure-activité pharmacologique des glucocorticoïdes	20
1.3.1 Les glucocorticoïdes naturels	20
1.3.2 Les glucocorticoïdes de synthèse	21
1.3.2.1 La Dexaméthasone	23
1.3.2.2 La Dexaméthasone 21-phosphate	23
1.3.2.3 Triamcinolone Acétonide	23
1.4 Le récepteur glucocorticoïde (RG)	23
1.4.1 Structure et organisation fonctionnelle du RG	23
1.4.2 Les domaines du RG et leur organisation fonctionnelle	24
1.4.3 Mécanisme d'action des glucocorticoïdes : le devenir du complexe RG-GC	25
1.4.3.1 La voie génomique dite « directe » des glucocorticoïdes	26
1.4.3.2 La voie non-génomique dite « indirecte » des glucocorticoïdes	27
1.4.3.3 La voie non génomique « rapide » des glucocorticoïdes	28
1.5 La pharmacodynamie des glucocorticoïdes	30
1.5.1 L'action sur le développement embryonnaire.....	30
1.5.2 Les actions métaboliques des glucocorticoïdes	30
1.5.2.1 Le métabolisme glucidique	30
1.5.2.2 Le métabolisme protéique	31
1.5.2.3 Le métabolisme lipidique	31

1.5.2.4	Le métabolisme de l'eau et des électrolytes	31
1.5.2.5	Le métabolisme phosphocalcique	32
1.5.3	L'activité anti-inflammatoire des glucocorticoïdes	32
1.5.3.1	Les médiateurs cellulaires de l'inflammation	33
1.5.3.2	Les médiateurs chimiques de l'inflammation	33
1.5.3.3	Action des GCs sur les médiateurs cellulaires	33
1.5.3.4	Action des GCs sur les médiateurs chimiques.....	34
1.5.4	L'activité anti-immuno-allergique des GCs.....	36
1.5.5	L'action antiangiogénique des GCs	37
1.5.6	La toxicité des glucocorticoïdes (effets secondaires)	37
1.5.6.1	Les effets toxiques sur les glandes endocrines.	37
1.5.6.2	Les effets toxiques sur le tissu osseux	38
1.5.6.3	Les effets toxiques sur le métabolisme	38
1.5.6.4	Les effets toxiques en ophtalmologie	39
1.6	Le développement des médicaments anti-inflammatoires en ophtalmologie.	39
2	L'œil.....	41
2.1	Anatomie générale de l'œil	41
2.1.1	Le segment antérieur	42
2.1.1.1	La cornée.....	42
2.1.1.2	L'iris	42
2.1.1.3	Le corps ciliaire	42
2.1.1.4	L'humeur aqueuse	42
2.1.1.5	Le cristallin.....	42
2.1.2	Le segment postérieur	43
2.1.2.1	Le corps vitré.....	43
2.1.2.2	La rétine	43
2.2	La vascularisation du segment postérieur de l'œil	51
2.2.1	La vascularisation de la rétine interne	52
2.2.2	La vascularisation choroïdienne.....	53
2.3	Les glucocorticoïdes en ophtalmologie	54
2.3.1	Le profil d'expression des récepteurs glucocorticoïdes dans l'œil.....	54
2.3.2	L'usage thérapeutique des glucocorticoïdes en ophtalmologie	55
2.3.2.1	Les pathologies traitées avec les GCs.....	56

2.3.3 La toxicité des glucocorticoïdes sur les vaisseaux	58
3 La mort cellulaire	61
3.1 Aperçu historique sur la mort cellulaire	61
3.2 La classification morpho-biochimique de la mort cellulaire	62
3.2.1 Autophagie	63
3.2.1.1 La macroautophagie	65
3.2.2 Nécrose.....	66
3.2.3 L'apoptose	68
3.2.3.1 Les principaux acteurs de l'apoptose.....	69
3.2.3.2 Voie apoptotique extrinsèque.....	85
3.2.3.3 Voie apoptotique intrinsèque	86
3.2.4 Autres types de mort cellulaire	87
3.2.4.1 La catastrophe mitotique	87
3.2.4.2 L'anoikis.	88
3.2.4.3 L'entosis.....	88
3.2.4.4 La pharthanatos	88
3.2.4.5 La netosis	88
3.2.4.6 La cornification	88
Chapitre II : Résultats.....	90
1 La toxicité des glucocorticoïdes(GCs) sur les cellules endothéliales (Article 1 : Glucocorticoids exert direct toxicity on microvasculature: Analysis of cell death mechanisms)	90
2 L'implication des récepteurs des GCs dans la toxicité induite par les GCs sur les cellules endothéliales	122
2.1 L'évaluation de la mort cellulaire induite par les GCs en présence des antagonistes de leurs cibles intracellulaires.	123
2.1.1 Technique	123
2.1.2 Résultats	123
3 XG-102, un agent thérapeutique de substitution aux GCs dans l'inflammation oculaire? (Article 2: Sub-conjunctival injection of XG-102, a c-Jun N-terminal kinase inhibitor peptide, in the treatment of endotoxin-induced uveitis in rats).....	126
Chapitre III : Discussion.....	148
1 Les effets des glucocorticoïdes sur l'endothélium microvasculaire : Synthèse Générale.....	148
1.1 Choix du traitement et des doses (cellules endothéliales)	148
1.2 Choix du modèle d'étude	150
1.3 Les cellules endothéliales, ont-elles toutes la même sensibilité aux glucocorticoïdes ?	151

1.4 Les GCs, exercent-ils la même toxicité sur les cellules ?.....	152
1.5 Quelle est la réponse des cellules endothéliales au stress provoqué par les GCs ?	152
1.6 La réponse aux GCs varie-t-elle en fonction de l'origine de l'endothélium?.....	155
1.7 La toxicité cellulaire est-elle médiée par les récepteurs stéroïdiens ?	156
2 Les limites de l'évaluation toxicologique des glucocorticoïdes.....	157
3 L'évaluation de la toxicité des GCs sur l'endothélium vasculaire	158
4 Inflammation oculaire : XG-102 futur candidat médicament	164
4.1 Choix du modèle d'étude.....	165
4.2 Le choix de la molécule thérapeutique	165
4.3 Analyses de résultats, limites et perspectives.....	166
5 Apport de ce Travail	167
6 Les perspectives.....	169
Chapitre IV : Conclusion	170
Bibliographie.....	171
Annexes	

Table des Figures et des Tableaux

Figure 1: Structure chimique des corticostéroïdes.....	14
Figure 2 : Couches du cortex de la surrénale.....	16
Figure 3 : Les principales étapes de la cascade de synthèse de cortisol (corticostérone).....	18
Figure 4 : Schéma général de la régulation de la sécrétion du cortisol via l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien.	20
Figure 5 : Structure chimique simplifiée du prégnane, le noyau de base des stéroïdes, formé de 18 atomes de carbone.	21
Figure 6 : La production des glucocorticoïdes de synthèse par des modifications substitutionnelles et conformationnelles sur le noyau prégnane de la cortisone.....	22
Tableau 1 : Classification et comparaison des activités pharmacologiques des différentes molécules de glucocorticoïdes.....	22
Figure 7 : Structure générale du récepteur des glucocorticoïdes.....	24
Figure 8: Mécanisme d'action du cortisol	29
Figure 9: Schéma récapitulatif des voies de signalisations intracellulaires induites par les GCs.....	36
Figure 10: Anatomie générale du globe oculaire.....	41
Figure 11: Les zones anatomiques macroscopiques de la rétine visibles sur un fond d'œil et les caractéristiques histologiques de la rétine centrale.....	44
Figure 12: Résumé schématique des principales fonctions de l'épithélium pigmenté de la rétine.	46
Figure 13 : Les propriétés morphologique des photorécepteurs cônes et bâtonnets.....	47
Figure 14: Intéractions des cellules gliales de Müller avec les neurones et les vaisseaux rétiniens dans une rétine mature	50
Figure 15: Architecture et morphologie des couches cellulaires de la rétine	51
Figure 16: Vascularisation du segment postérieur	54
Figure 17: La répartition des récepteurs des glucocorticoïdes dans la rétine.....	55
Figure 18: Les images de la tomographie à cohérence optique d'une patiente de 85 ans présentant un œdème maculaire consécutif à une obstruction de la veine centrale de la rétine.	58
Figure 19 : Schéma d'une cellule autophagique séquestrant les différents constituants de la cellule dans les conditions physiopathologiques.....	65
Figure 20 : Illustration simplifiée des différentes étapes de la macroautophagie.....	66
Figure 21 : Schéma comparatif des caractéristiques morphologiques de la nécrose versus apoptose. .68	
Figure 22: Schéma du mécanisme général d'activation des caspases.....	70
Figure 23: L'assemblage de l'apoptosome.....	71

Figure 24 : Recrutement et auto-activation des caspases initiatrices par les récepteurs membranaires.	72
Figure 25 : L'apoptose orchestrée par la mitochondrie par l'intermédiaire des protéines apoptogènes mitochondriales.	78
Figure 26 : La LEI/L-DNaseII.	84
Figure 27 : Le rôle de la LEI/L-DNaseII dans la mort par apoptose.	85
Figure 28 : Les deux voies d'activation de l'apoptose, la voie mitochondriale ou intrinsèque et la voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque.	87
Figure 29 : Examen par tomographie en cohérence optique (OCT) d'un œdème maculaire secondaire à une rétinopathie diabétique.	90
Figure 30 : Analyse d'une coupe semi-fine de la chorioretine 30 jours après traitement avec la TA.	91
Figure 31 : Vue frontale de moulages choroïde montés 30 jours après l'injection intravitréenne de la TA chez le rat Albino.	92
Figure 32 : La viabilité cellulaire estimée par le test MTT, dans les HMEC après 24 heures de traitement par les GCs, et/ou les antagonistes pharmacologiques des leurs récepteurs (RU 486) et minéralocorticoïdes (RU 754) ou les deux ensembles.	125
Tableau 2 : Récapitulatif des doses de glucocorticoïdes induisant 50% de mort cellulaire après 24 heures de traitement dans les HMEC et les BREC.	149
Tableau 3 : Liste non exhaustive des études évaluant les effets des glucocorticoïdes sur les cellules endothéliales et les vaisseaux in vitro et in vivo.	163

Table des abréviations

A

ACTH:	Hormone adrénocorticotrope
ADN:	Acide désoxyribonucléique
AF-1:	Activation function 1
AIF:	Apoptosis inducing factor
AMC :	Autophagie médiée par les protéines chaperonnes
Apaf-1:	Apoptotic protease activating factor-1
AQP-2:	Aquaporine-2
AQP-4:	Aquaporine-4
ARPE 19:	Adult Retinal pigmented Epithelium
ATG :	Autophagy related genes
ATP:	Adénosine 5'-Triphosphate

B

Bak:	BCL2-Antagonist/Killer
BAX:	Bcl2 Associated X protein
BCA :	Acide bicinchoninique
BCL-XL :	B-cell lymphoma-extra large
BCL2 :	B cell lymphoma 2
BET:	Bromure d'ethidium
BH:	Bcl-2 Homology
BHK :	Baby hamster kidney
Bid:	BH3 Interacting Domain death agonist
Bim:	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
BSA:	Bovine serum albumin

C

Ca⁺² :	Calcium
CAD:	Caspase activated deoxyribonuclease
Caspase:	Cysteinyln aspartate specific protease
CBG	Corticosteroid binding globulin
CMG:	Cellule gliale de Muller
CNE:	Couche nucléaire externe
CNI:	Couche nucléaire interne
COX-2:	Cyclo-oxygénase de type 2
CPI:	Couche plexiforme interne
CRH :	Corticotropin-releasing hormone
CRSC:	Choriorétinopathie séreuse centrale
Cyt c :	Cytochrome c

D

DAPI:	4', 6-diamine-2'phenylindole dihydrochloride
DBD:	Domaine de liaison à l'ADN
DED:	Death Effector Domain
Dex:	Dexaméthasone
Dex-Ph:	Dexaméthasone Phosphate
DFF40/CAD:	DNA Fragmentation Factor 40/ Caspase Activated-DNase
DISC:	Death inducing signaling complex

DMEM: Dulbecco's Minimum Essential Medium
DR Death receptor

E

EDTA Acide éthylène diamine tétra-acétique
ENaC: Canal épithélial à sodium (epithelial sodium channel)
EndoG Endonucléase G
eNOS: NO synthase endothéliale
EPR: Epithélium pigmenté de la rétine
ERO: Espèces réactives de l'oxygène
Erk Extracellular signal-Related Kinases

F

FADD: Fas Associated Death Domain

G

GAAD : Granzyme A activated DNase
GFAP: protéine gliale fibrillaire acide (glial fibrillary acid protein)
GMPC: Guanosine monophosphate cyclique
GSH : Glutathion
GTP : Guanosine triphosphate

H

HMA Hexamethylene amiloride
HSC Heat shock cognate
HSD2: 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2
HSP: Protéine de choc thermique (heat shock protein)

I

IAP Inhibitor of Apoptosis Proteins
ICAD Inhibitor of caspase activated deoxyribonuclease
IFN- α Interféron- α
I κ B Inhibitor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
IL Interleukines
iNOS: NO synthase inductible

J

JNK c-Jun N-terminal Kinase

K

kDa kiloDalton
Kir4.1: Inward-rectifier potassium ion channel
KO Knock-Out

L

LAMP Lysosome associated membrane protein
LC3 Light chain 3
L-Dnase II LEI-derived desoxyribonuclease II
LEI Leucocyte Elastase inhibitor

M

m TOR Mammalian target of rapamycin
MAPK Mitogen Associated Protein Kinase

N

NES Nuclear export signal
NFκB: Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NLS Nuclear localisation signal
NO Monoxyde d'azote
NTD: Domaine N terminal

O

OCT: Tomographie en cohérence optique
Omi/HtrA2 HtrA serine peptidase 2

P

PARP Poly (ADP-ribose) polymerase
PM Poids moléculaire

R

RG : Récepteur glucocorticoïde
RM: Récepteur minéralocorticoïde
ROP Rétinopathie du prématuré

S

SDS Sodium dodecyl sulfate
Serpin Serine protease inhibitor
Smac/Diablo Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct IAP

T

t-Bid Bid tronqué
TNF Tumor Necrosis Factor
TNFR Tumor Necrosis Factor Receptor
TRADD TNF Receptor Associated Death Domain
TRAIL TNF related apoptosis inducing ligand
Tris Trishydroxyméthylaminométhane
TUNEL Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

V

VEGF vascular endothelium growth factor
VDAC Voltage-Dependent Anion Channel
VIH Virus de l'Immunodéficience Humaine

X

XIAP X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

Y

ΔΨ_m Potentiel transmembranaire mitochondrial

Avant propos

Les glucocorticoïdes appartiennent à la grande famille des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Ce sont des hormones naturelles, semi-synthétiques ou synthétiques, dérivées du cortisol endogène. Leurs vertus anti-inflammatoires dans les polyarthrites rhumatoïdes ont valu, en 1950, à *Philip Showalter Hench, Tadeusz Reichstein et Edward Calvin Kendall* le prix Nobel de Médecine et Physiologie.

Nommés « Molécule miracle » grâce à leur action rapide et spectaculaire, ils ont soulevé beaucoup d'espoir et d'enthousiasme pour soigner diverses maladies et jusqu'à l'heure actuelle ils sont considérés comme extrêmement efficaces et parfois irremplaçables. Malgré leur rôle capital en thérapeutique humaine, ils ont suscité beaucoup de réserve en raison de leurs effets secondaires et des difficultés rencontrées au cours des corticothérapies, notamment sur la microvascularisation dans les différents tissus de l'organisme.

Rapidement, les glucocorticoïdes ont envahi toutes les disciplines médicales pour le traitement d'innombrables maladies, entre autres, les maladies oculaires afin de réduire les phénomènes inflammatoires, angiogéniques et œdémateux à pronostic défavorable sur la fonction visuelle. En effet, depuis plusieurs années les glucocorticoïdes sont injectés en intraoculaire sous une formulation cristalline non soluble (Triamcinolone acétonide) ou plus récemment sous forme d'implant polymérique à libération prolongée (Dexaméthasone) mais sans réelle interrogation quant à leur potentiel toxique au niveau des structures vasculaires de l'œil, notamment le réseau vasculaire rétinien directement en contact avec les produits administrés. De plus que ces formes injectables intraoculaires ont été utilisées sans autorisation de mise sur le marché (AMM) dans ces indications et ce mode d'administration et les outils d'évaluation de la cytotoxicité ne sont pas toujours adéquats. Parallèlement, dans d'autres organes, les concentrations supraphysiologiques des glucocorticoïdes ont été à plusieurs reprises la source de fragilité microvasculaire.

Ces traitements manquent actuellement d'évaluation systématique et randomisée et de données toxicologiques sur les structures internes de l'œil et les vaisseaux qui assurent leur survie. En effet, on ne connaît pas exactement, le devenir du produit injecté dans le vitré, la cinétique de sa libération, sa clairance, la dose précise à injecter et enfin, les effets toxiques potentiels relatifs à chaque principe actif, particulièrement les mécanismes de mort cellulaire déclenchés dans les traitements aigus ou lors des administrations répétées.

Actuellement de nombreux laboratoires pharmaceutiques visent à développer de nouvelles molécules pour répondre au compromis d'obtenir une efficacité thérapeutique équivalente aux glucocorticoïdes avec moins d'effets secondaires sur les tissus.

De ces faits et afin d'apporter de nouvelles connaissances relatives à la toxicité cellulaire de ces molécules, les bases sur lesquelles reposent mon projet de thèse se sont établies.

Mon Travail de thèse s'est effectué au centre de recherche des cordeliers, au sein de l'équipe 17 « physiopathologie des maladies oculaires : Innovations thérapeutiques » dirigée par le professeur Francine Behar Cohen.

Dans notre unité les recherches sur les mécanismes responsables des pathologies oculaires et l'essor de nouvelles stratégies thérapeutiques sont développés grâce à la collaboration de plusieurs groupes de chercheurs fundamentalistes et cliniciens.

Dans notre équipe nous nous intéressons à la toxicité des glucocorticoïdes très utilisés en ophtalmologie sur les systèmes vasculaires de la rétine et le développement de nouvelles stratégies pour le traitement des pathologies inflammatoires.

Avant d'approfondir ces thématiques, nous présenterons les propriétés pharmacologiques des glucocorticoïdes, une attention particulière sera prêtée à leurs structures physicochimiques, leur rôle anti-inflammatoire et leur toxicité cellulaire. Une petite partie sera consacrée à l'innovation dans le traitement de l'inflammation intraoculaire. Ensuite les caractéristiques de l'œil, l'anatomie cellulaire et vasculaire de l'organe de vision seront décrits. Nous finirons par une partie dédiée à la description de la mort cellulaire et ses effecteurs, en insistant sur la nécrose, l'autophagie et avec de plus amples détails sur l'apoptose.

Chapitre I : Introduction Bibliographique

1 Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes (GCs) appartiennent à la famille des hormones Stéroïdes. Le terme glucocorticoïdes découle du principal représentant endogène de cette classe pharmacologique, **le cortisol** (chez l'Homme et les primates), **la corticostérone** chez les rongeurs (Figure1) (1). Les GCs naturels, notamment le chef de file, le cortisol, jouent un rôle capital dans la physiologie de diverses fonctions essentielles pour l'organisme et son homéostasie. Ils sont synthétisés dans la glande corticosurrénaliennne à partir du cholestérol. La découverte des GCs a bouleversé le traitement de certaines maladies, ils sont considérés jusqu'à l'heure actuelle, extrêmement efficaces et parfois irremplaçables. Cette classe thérapeutique est une des plus anciennes connue et des plus prescrites.

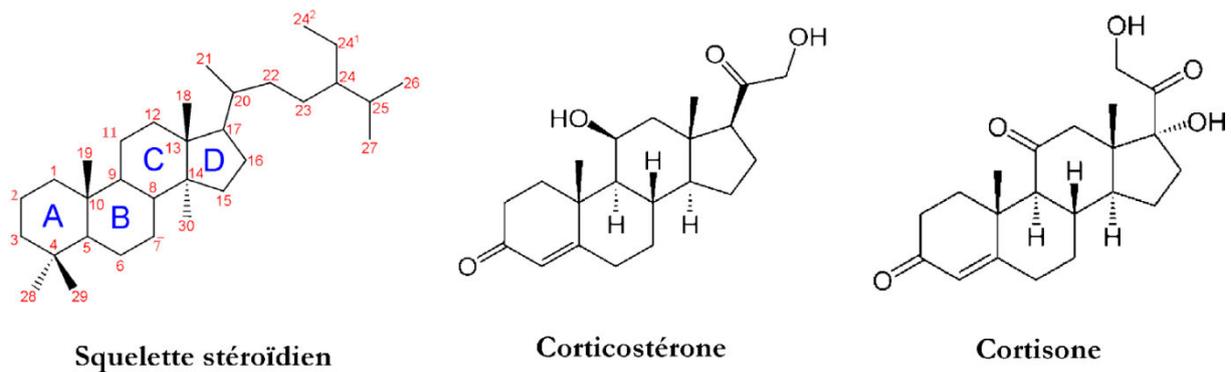


Figure 1: Structure chimique des corticostéroïdes. (F.Chast. 2013 doi: 10.1016/j).

1.1 Historique

En 1845 *Thomas Addison* attribue la maladie qui porte son nom à des anomalies anatomo-cliniques de la glande surrénale (2). Par des expériences de surrénalectomie sur les animaux, *Charles Edouard Brown Sequard* montre en 1856 le rôle vital de cette glande. *William Osler*, en 1896, est le premier à décrire le traitement de la maladie d'Addison par des extraits de glandes corticosurrénales.

En 1936, *Hans Seyle*, endocrinologue, forge le concept du syndrome général d'adaptation au stress et l'intérêt de la corticostérone dans le traitement des chocs (Brûlure, traumatisme, etc.).

Les grandes avancées sur les GCs ont été réalisées à la fin de la seconde guerre mondiale, quand le Pentagone (Département de la Défense des Etats Unis) a voulu les utiliser chez les

pilotes pour résister au stress et à la fatigue des combats aériens. C'est alors que la première molécule le 11-dehydrocorticostérone (la cortisone) trouva un mode de synthèse industrielle.

La première administration médicale des GCs chez l'homme fut réalisée en 1948 pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde (3). Pour l'histoire, deux médecins de Boston (États-Unis), *Homburger et Bonner*, qui s'intéressaient à l'art, découvrent dans un bref article de Life magazine, une photographie de *Raoul Dufy*, un artiste peintre, montrant les déformations articulaires caractéristiques de la polyarthrite dont il souffrait depuis plusieurs années. Ils lui écrivirent pour lui proposer un traitement expérimental par la cortisone. Très vite, ce traitement permit à *Dufy* de remarcher et de presser sans la moindre aide sur ses tubes de couleurs. En 1950, *Tadeus Reichstein* professeur à la faculté de pharmacie de Basel (Suisse), *Philip Showalter Hench et Edward Clavin Kendall* de la Mayo Rochester clinic sont lauréats du prix Nobel de médecine et physiologie « pour leurs découvertes sur les hormones du cortex des glandes surrénales, leurs structures et leurs effets biologiques (4-5). Depuis, les corticothérapies ont sauvé d'innombrables vies qu'il s'agisse de l'asthme, du choc septique, de maladies auto-immunes, ainsi que des maladies dites orphelines dont la corticothérapie a complètement transformé le pronostic vital. Malgré ce rôle capital en thérapeutique humaine, les GCs ont une réputation ternie par les effets secondaires liés à leur utilisation.

1.2 Synthèse endogène des glucocorticoïdes

1.2.1 Origine

La biosynthèse des hormones stéroïdiennes s'effectue dans les glandes corticosurrénales (situées au-dessus des reins), les ovaires, le placenta, les testicules (Cellules de Leydig) et le cerveau, à partir du cholestérol et des acétates, les substances à la base de la production de tous les stéroïdes physiologiques. Le cholestérol utilisé pour la synthèse des GCs est essentiellement d'origine alimentaire (LDL-cholestérol), accessoirement produit par le cortex surrénal et le foie.

La corticosurrénale chez l'adulte secrète trois types d'hormones stéroïdiennes : les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes et les androgènes. Chacune de ces hormones est secrétée préférentiellement dans l'une des trois zones de la corticosurrénale (Figure 2).

-La zone glomérulée secrète principalement les minéralocorticoïdes.

-Les zones fasciculée et réticulée synthétisent les androgènes et les glucocorticoïdes.

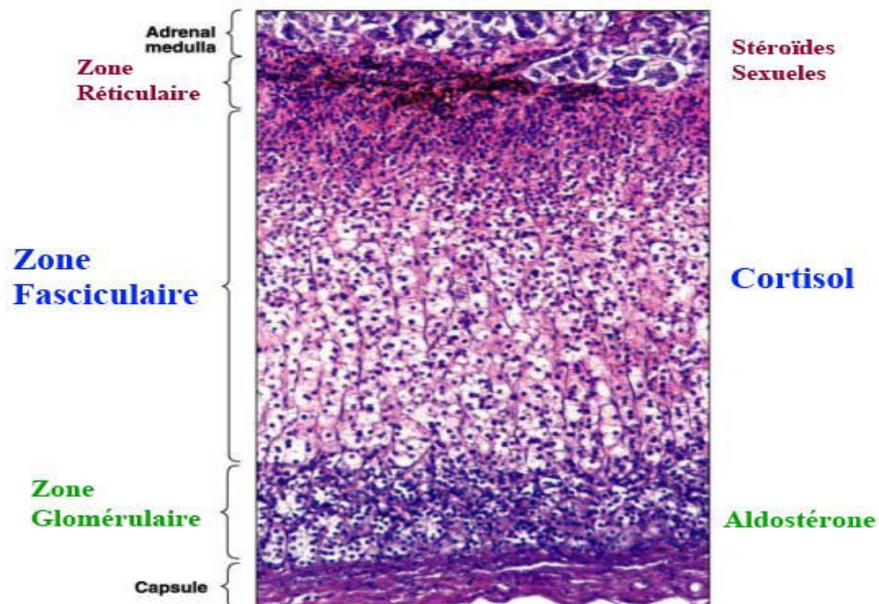
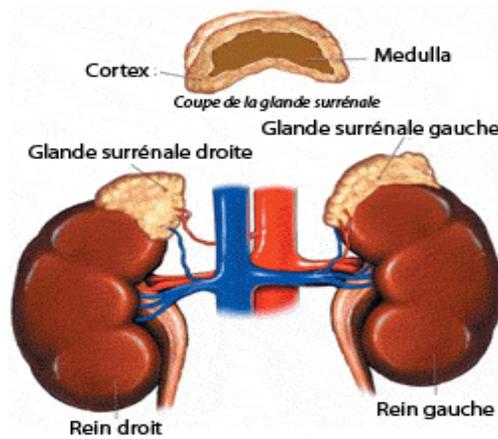


Figure 2 : Couches du cortex de la surrénale. Coupe histologique décrivant l'aspect schématique des trois couches de la corticosurrénale responsables de la synthèse des hormones stéroïdiennes (*Dr. Gayrard Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse*)

1.2.2 La stéroïdogénèse

La synthèse du cortisol requiert le cholestérol et les diverses réactions sont catalysées par un panel d'enzymes d'une extrême spécificité et dont l'expression est tissu-dépendante.

(Figure3)

1.2.2.1 La première étape, la formation de prégnénone

Le cholestérol est capté de la circulation générale, par la glande surrénale, seule une petite proportion est synthétisée *in situ*. La scission de la chaîne latérale de la molécule se fait dans la membrane interne de la mitochondrie, grâce à un système enzymatique complexe appelé *cytochrome P450_{scc}* (*scc* : *side-chain cleavage*) (Figure 3) formé de desmolases et d'hydroxylases qui interviennent pour couper la liaison entre deux carbones oxydés (6), livrant ainsi la prégnénone. Cette réaction est commune à la synthèse de tous les stéroïdes.

1.2.2.2 La deuxième étape, la synthèse du cortisol

Cette étape s'effectue essentiellement dans la couche fasciculée. La prégnénone sort de la mitochondrie, grâce à sa lipophilicité, elle traverse la membrane du réticulum endoplasmique lisse où elle sera convertie en cortisol après une succession de réactions enzymatiques. La prégnénone est transformée en 17-hydroxyprégnénone par le P450_{c17} (17 α -hydroxylase). Après une oxydation en C3 et une isomérisation au niveau de la liaison éthylique grâce à la 3 β -Hydroxystéroïde déshydrogénase, celle-ci donne naissance à la 17 α hydroxyprogestérone. Cette dernière subit l'action du P450_{c21} (hydroxylase), du P450_{c17} pour finir en 11-désoxycortisol. Ce dernier est dirigé vers la membrane interne de la mitochondrie pour être converti par la P450_{c11} (b-hydroxylase) en cortisol. Ce précurseur de la cortisone est également appelé hydrocortisone.

1.2.2.3 La troisième étape, l'obtention de la cortisone

La cortisone, faiblement active, est obtenue secondairement par catabolisme du cortisol. L'équilibre entre les deux molécules est régi par la 11 β -Hydroxystéroïde-déshydrogénase 2, qui est essentiellement, mais pas exclusivement, hépatique, puisqu'elle a été isolée au niveau des organes dits minéralo-dépendants comme les organes lymphoïdes, le rein, l'intestin et la rétine (très récemment identifiée) (7) (Figure 3). Cette étape est primordiale pour l'homéostasie hydroélectrolytique. Bien que faibles, le cortisol possède des propriétés minéralocorticoïdes dues à son analogie structurelle avec ces hormones ce qui lui permet de lier leurs récepteurs cellulaires. Mais grâce à la 11 β -Hydroxystéroïde-déshydrogénase 2, l'action des minéralocorticoïdes n'est pas contrée par la présence du cortisol actif.

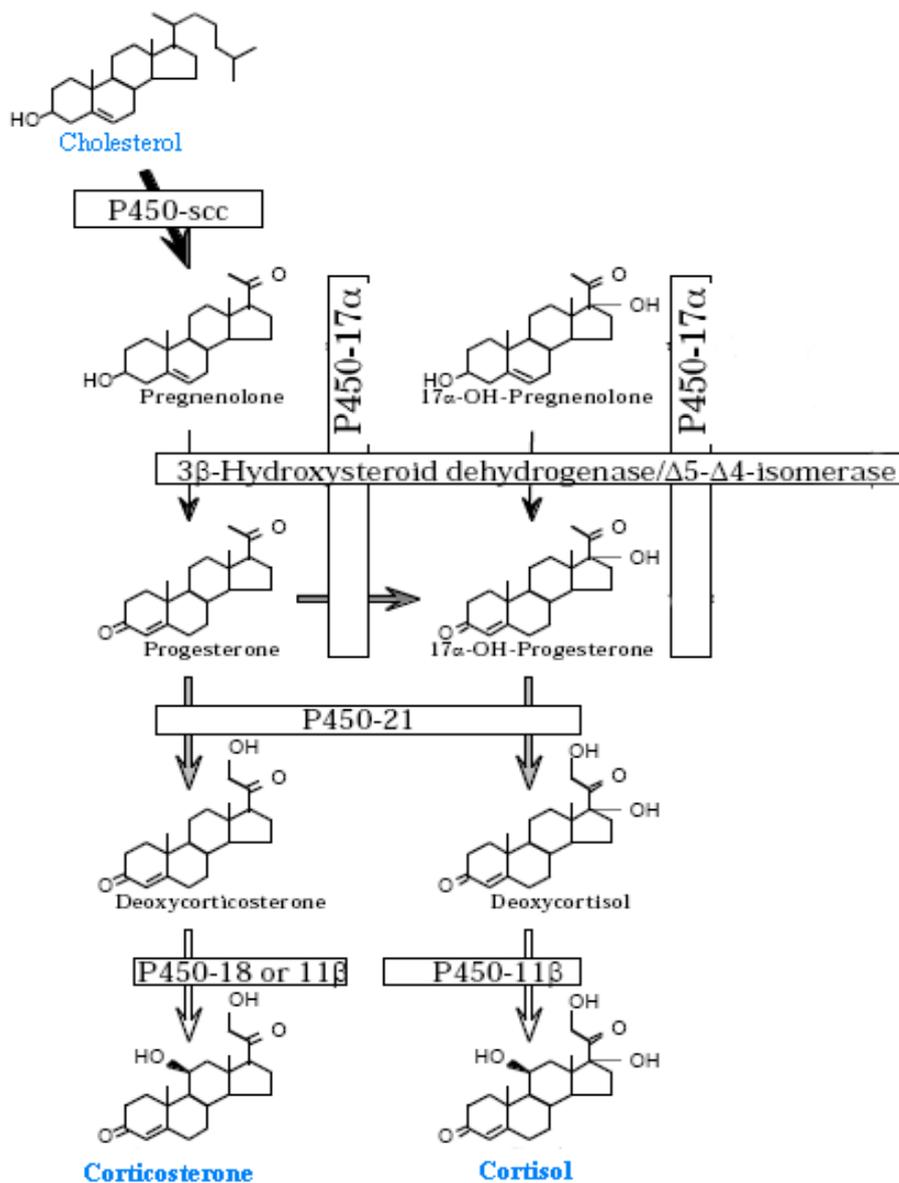


Figure 3 : Les principales étapes de la cascade de synthèse de cortisol (corticostérone). Initialement, les cytochromes P450scc servent d'intermédiaire pour convertir le cholestérol en prégnénolone. Par la suite, La 3β-Hydroxystéroïde déshydrogénase une fois activée, donne naissance à la progestérone. Puis, le cytochrome P450c21 catalyse l'hydroxylation de la progestérone en 11-déoxycortisol et en fin, le P450c11β convertie le 11-déoxycortisol en cortisol.

(D'après : <http://www.rose-hulman.edu/brandt/Chem330/EndocrineNotes>).

1.2.3 La régulation de la cortisolémie

Le cortisol est synthétisé et libéré dans l'organisme en réponse à un stress physique, métabolique ou émotionnel. Il exerce son activité physiologique dans diverses fonctions essentielles pour l'organisme et son homéostasie; il intervient notamment dans la régulation de la tension artérielle et de la fonction cardio-vasculaire, de la croissance, le métabolisme des glucides, lipides, protides, de la fonction immunitaire et de la régulation du système nerveux central.

La synthèse de cortisol est placée sous le contrôle de la corticostimuline (CRH) et de la corticotropine ou hormone corticotrope (ACTH). La CRH est un neuropeptide synthétisé dans l'hypothalamus. Une fois libérée elle est transportée vers l'hypophyse où elle stimule la production et la libération de l'ACTH. En quelques minutes, l'activation de la corticosurrénale par l'ACTH conduit à la synthèse et la sécrétion des GCs (8-9). A long terme elle entraîne l'augmentation de la taille et du nombre des cellules cortico-surréaliennes, l'augmentation de l'expression des enzymes impliquées dans la production du cortisol, de leurs co-facteurs et des récepteurs surréaliens au cholestérol (10) (11).

La sécrétion des GCs ne dépend pas uniquement de l'axe hypothalamo-hypophysaire. En effet, plusieurs neurotransmetteurs peuvent stimuler la sécrétion de ces hormones, entre autres, la sérotonine et le neuropeptide Y, qui en stimulant la production de l'ACTH, stimulent indirectement la sécrétion des GCs. Aussi, en fonction de l'événement stressant, de son intensité et de sa durée, des facteurs plasmatiques comme l'angiotensine II ou les cytokines peuvent potentialiser la réaction de l'axe corticotrope (12-13). Le cortisol libéré exerce une boucle de rétrocontrôle au niveau hypothalamique (CRH) mais aussi hypophysaire (ACTH) (14). En effet, quand le taux plasmatique du cortisol augmente, ce « feedback » sert à limiter la durée d'exposition des tissus aux effets délétères des GCs en bloquant la synthèse et la sécrétion du CRH et de l'ACTH. Lorsque la cortisolémie est inférieure aux taux minimaux, cette inhibition est supprimée et la sécrétion du CRH et l'ACTH augmente pour rétablir le niveau hormonal basal des GCs (15) (Figure 4).

La production moyenne de cortisol est de 55 $\mu\text{mol/j}$ chez l'homme et de 40 $\mu\text{mol/j}$ chez la femme. La concentration plasmatique suit un rythme circadien : elle est d'environ 15 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ à 8h du matin et varie de 50 à 160 $\text{ng}/100\text{ ml}$ pour atteindre une concentration minimale vers 24h. Environ 90% du cortisol est lié à la transcortine ou corticostéroïd binding globulin (CBG) (16), le reste demeure libre dans le plasma, la liaison à l'albumine est négligeable dans les constantes physiologiques normales. Les GCs de synthèse, à l'exception de la prédnisolone, sont transportés préférentiellement par l'albumine (17). Seule la fraction libre dans le plasma est active sur les tissus cibles (18-19).

La demi-vie plasmatique du cortisol est de 50 à 90 min. Il est métabolisé principalement au niveau du foie où il est réduit et conjugué en glucuronides puis éliminé sous forme de métabolite hydrosoluble dans les urines. Une petite fraction peut être éliminée sous forme

libre sans transformation. Les mêmes processus sont rencontrés chez le rat avec la corticostérone (20).

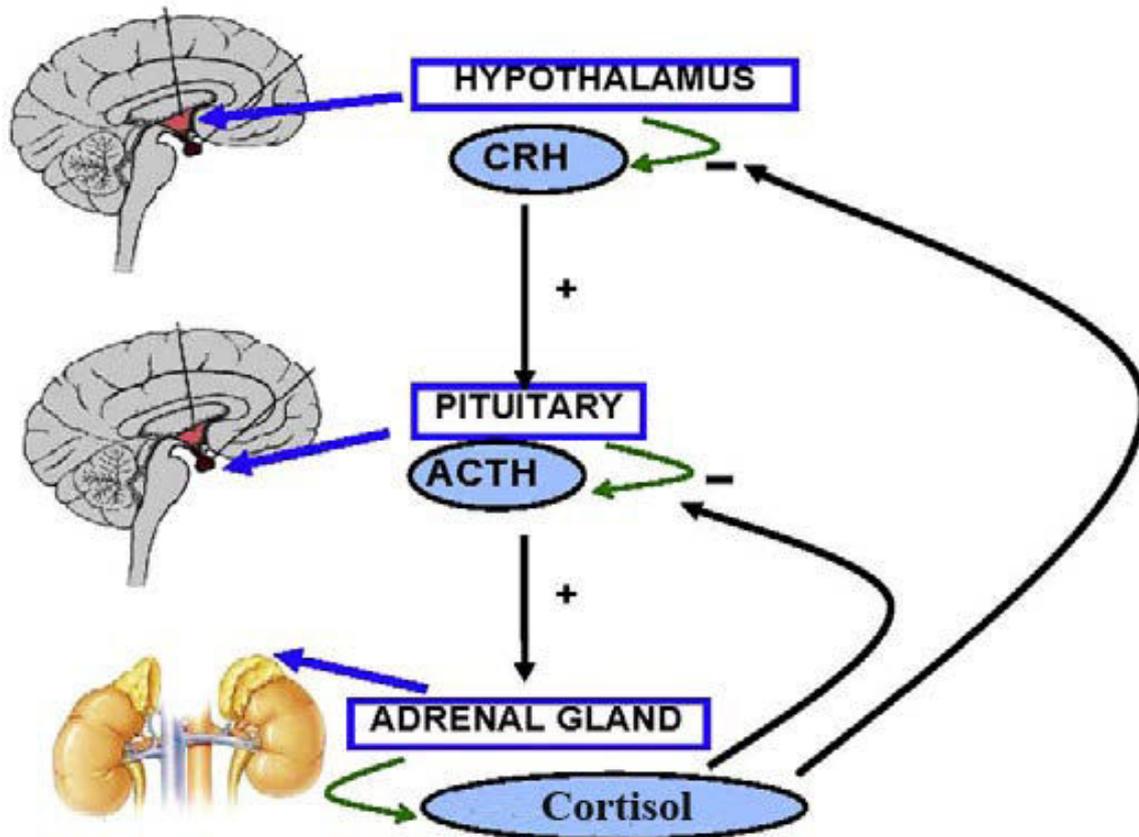


Figure 4 : Schéma général de la régulation de la sécrétion du cortisol via l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. (D'après Marta Llansola, 2013).

1.3 La relation structure-activité pharmacologique des glucocorticoïdes

1.3.1 Les glucocorticoïdes naturels

L'hydrocortisone ou cortisol a été la première molécule naturelle isolée et utilisée en thérapeutique. Le cortisol est l'hormone humaine sécrétée à raison de 20 mg/j en moyenne. Tous les GCs comprennent 21 carbones et possèdent comme squelette de base le 5 β -prégnane (Figure 5). La présence de deux fonctions cétone (C=O) en position C3 et C20, d'une double liaison C4-C5 sur le cycle A et deux fonctions hydroxyle (OH) en position C11 et C17 sont indispensables pour l'activer les glucocorticoïdes (21).

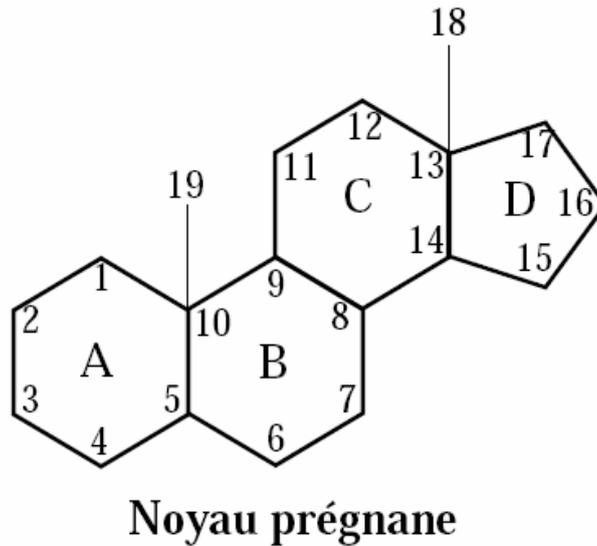


Figure 5 : Structure chimique simplifiée du prégnane, le noyau de base des stéroïdes, formé de 18 atomes de carbone.

1.3.2 Les glucocorticoïdes de synthèse

Les GCs de synthèse dérivent de la molécule princeps « le cortisol », pour lequel on a cherché à majorer certaines propriétés glucocorticoïdes au détriment des effets minéralocorticoïdes. Comme les hormones naturelles, les GCs de synthèse ont une structure à quatre cycles. Certaines modifications structurales, telles que la fixation d'un atome de fluor en C9 ou C6, la substitution d'OH ou CH₃ en C16 ou C17 ou bien la fixation d'un méthyle en C1 sur le cycle A entraînent une modification de leurs propriétés pharmacocinétiques et/ ou pharmacodynamiques avec un pouvoir anti-inflammatoire multiplié de 5 à 40 (21) (Figure 6). Il faut noter, néanmoins que la comparaison de la puissance anti-inflammatoire des différents corticoïdes est réalisée *in vitro* et ne reflète pas nécessairement la réalité *in vivo*. Celle-ci dépend de la voie d'administration, de l'absorption digestive, de la biodisponibilité du principe actif, de la demi-vie d'élimination et de la liaison aux protéines plasmatiques. (Tableau 1) (21).

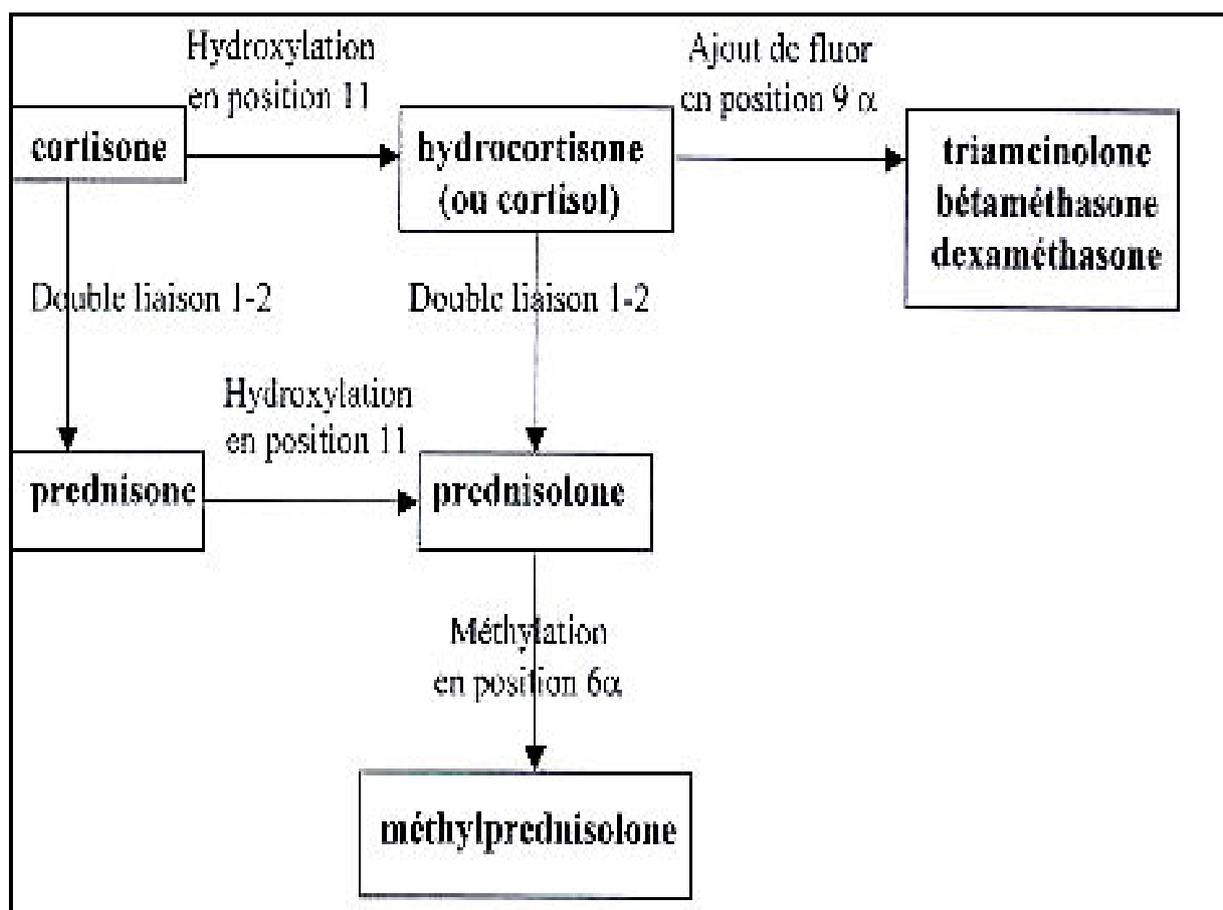


Figure 6 : La production des glucocorticoïdes de synthèse par des modifications substitutionnelles et conformationnelles sur le noyau prégnane de la cortisone. (Pris de <http://perso.orange.fr/corine.bensimon/corticost%8eroides.html>).

Glucocorticoïde	Molécule	Equivalent Posologique en mg	Effets anti-inflammatoire	Effet Minéralocorticoïde	Pouvoir freinateur	Demi-vie plasmatique
Naturels	Hydrocortisone	20	1	1	1	8-12h
	cortisol	25	0,8	0,8	1	8-12h
D1 dérivés	Prédnisolone	5	3-4	0,8	1	18-36h
	Prednisone	5	3-4	0,8	1	18-36h
Substitués fluorés 9α	Triamcinolone	4	5-10	0	5	36-54h
	Dexamethasone	0,75	20-40	0	50	>60h
	Betamethasone	0,75	25-40	0	50	36-54h
Substitués non fluorés	Méthylprédnisolone	4	4-5	0,2-0,5	4-5	36-54h
	Cortivazol	0,3	40-50	0,05	50	-

Tableau 1 : Classification et comparaison des activités pharmacologiques des différentes molécules de glucocorticoïdes. Le pouvoir thérapeutique des GCs dépend de la composition chimique, l'intensité de l'action anti-inflammatoire et la pharmacocinétique de chaque molécule. (*Actualités pharmaceutiques n° 503 Février 2011*).

Parmi les glucocorticoïdes de synthèse les plus utilisés en clinique quatre sont en tête de file : Dexaméthasone, Hydrocortisone, Dexaméthasone phosphate et Triamcinolone Acétonide. Ils ont été choisis pour la réalisation de nos recherches.

1.3.2.1 La Dexaméthasone est un glucocorticoïde disponible sous plusieurs formes galéniques destinées à la voie orale, intraveineuse ou topique (collyres et pommades), sa formule chimique est : 9 α -fluoro-11 β , 17 α , 21-trihydroxy-16 α -méthylprégna-1,4-diène-3,20-dione. La présence d'un halogène, le fluor en position 9 et la double liaison 1-21 augmentent son activité anti-inflammatoire et diminuent l'activité minéralocorticoïde. L'introduction sur le cycle D en C16 d'un méthyle diminue la rétention sodée et augmente la stabilité métabolique (22). Il agit aux différents stades de l'inflammation.

1.3.2.2 La Dexaméthasone 21-phosphate est un glucocorticoïde de synthèse de formule chimique : 9 α -fluoro-11 β , 17 α , 21-trihydroxy-16 α -méthylprégna-1,4-diène-3,20-dione 21-(dihydrogène phosphate). Il a les mêmes propriétés chimiques que la Dexaméthasone sauf que l'estérification par un phosphate en C21 augmente son hydrosolubilité (22).

1.3.2.3 La Triamcinolone Acétonide est le glucocorticoïde le plus injecté dans l'œil, il s'agit du 9 α -fluoro-11 β -11 β , 21-dihydroxy-16 α , 17 α isopropylidènedioxyprègna-1,4-diène-3,20-dione, qui se présente sous la forme d'une poudre cristalline blanche. La double liaison 1-2, l'hydroxyle en C 16, le fluor en C 9, augmentent son activité anti-inflammatoire et diminuent son activité minéralocorticoïde. L'introduction sur le cycle D en C16 d'un hydroxyle diminue la rétention sodée, augmente sa stabilité métabolique et rend possible l'utilisation par voie générale des dérivés 9- α -fluorés. Néanmoins ces dérivés sont réservés à l'administration locale (22).

1.4 Le récepteur glucocorticoïde (RG)

1.4.1 Structure et organisation fonctionnelle du RG

La régulation positive (transactivation) ou négative (transrépression) de la transcription génique par les récepteurs glucocorticoïdes lors de la liaison à leur ligand est impliquée dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Le RG est une protéine appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires composée des récepteurs aux hormones stéroïdes (œstrogène, progestérone, androgène), aux hormones thyroïdiennes, de la vitamine D, de l'acide rétinoïque, ainsi que des récepteurs dits orphelins, sans ligand identifié (23-24).

Chez l'homme le gène qui code pour le RG (NR3C1) est localisé sur le chromosome 5q31-32. Ce gène comprend 10 exons dont un est inactif, l'épissage alternatif de l'exon 9 a conduit à

deux isoformes du récepteur, d'une grande homologie structurale, $RG\alpha$ (Formé de 777 acides aminés (aa)) et le $RG\beta$ (Constitué de 745 aa) (25) (Figure 7).

Le $RG\alpha$ est l'acteur principal de la fonction transcriptionnelle ligand-dépendante des GCs. Il est le plus abondant dans l'organisme. Il est distribué de manière ubiquitaire avec une densité intracellulaire qui varie en fonction des organes. Quant au $RG\beta$, il est peu exprimé, inactif, car il ne lie pas les GCs et souvent impliqué dans les phénomènes de résistance aux corticothérapies. En effet, lors du traitement de certaines maladies chroniques avec les GCs il y a une surexpression du $RG\beta$ qui conduit à une insensibilité au médicament car il exerce un effet dominant négatif sur l'activité transcriptionnelle du $GR\alpha$ par la liaison à des cofacteurs ou une compétition au niveau des sites de fixation de l'ADN (24-26).

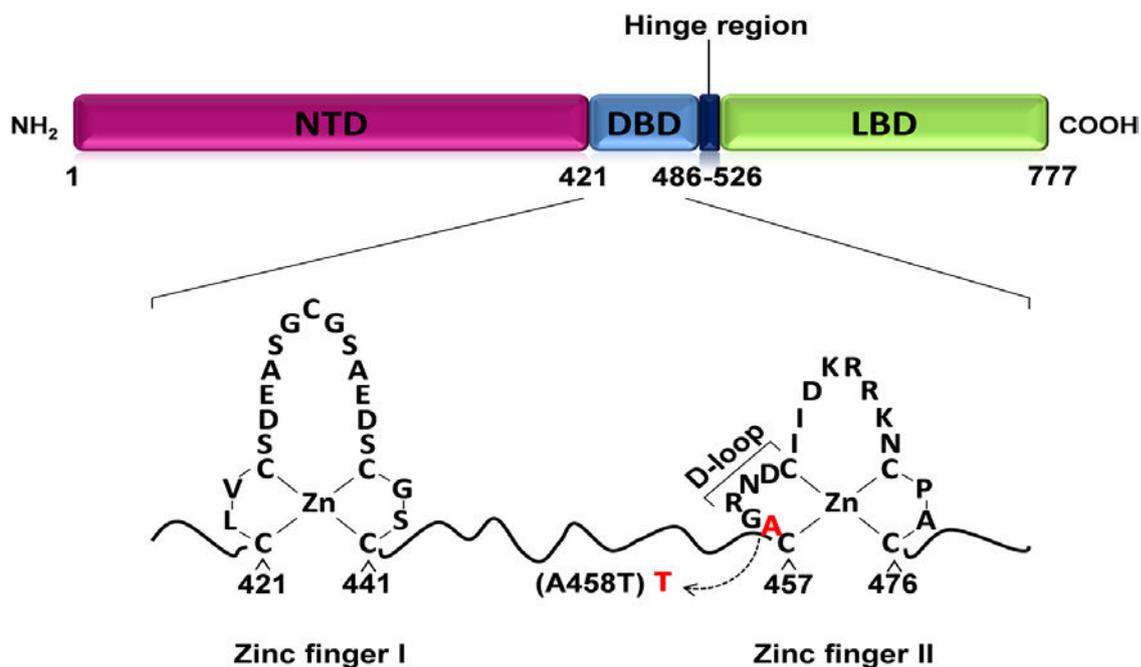


Figure 7 : Structure générale du récepteur aux glucocorticoïdes. Le GR est constitué de trois domaines : un domaine N-terminal(NTD) responsable de l'activité transcriptionnelle du RG, un domaine central (DBN) qui constitue le site de reconnaissance de l'élément de réponse des RGs au niveau de l'ADN et un domaine C-terminal(LBD) qui permet la fixation du ligand. Le domaine(DBN) contient deux doigts de zinc essentiels au fonctionnement du récepteur. (D'après Sofie Vandevyver 2013).

1.4.2 Les domaines du RG et leur organisation fonctionnelle

A partir des études réalisées sur le RG humain, trois domaines structuraux distincts ont été identifiés.

- Un domaine N-terminal(NTD) composé de 410 aa, il est le plus long des trois domaines. Il joue un rôle important dans l'induction de la transcription et confère aux RG sa spécificité de liaison à l'ADN, notamment grâce à une région de transactivation

majeure (activation function : AF-1), localisée entre les acides aminés 77 et 262. L'AF-1 interagit avec les cofacteurs (SRC-1 : steroid receptor coactivator, TIF2 : transcriptional intermediary factor, CBP : CREB-Binding Protein) et les modulateurs de l'état de condensation de la chromatine indispensables à l'initiation de la transcription des gènes cibles (27).

- Un domaine central de liaison à l'ADN ou DNA Binding Domain (DBN), hautement conservé chez tous les récepteurs aux stéroïdes. Cette région formée de 65 à 70 aa, contient le site de reconnaissance des séquences d'ADN spécifiques constituant les éléments de réponse aux glucocorticoïdes (glucocorticoid-response elements [GRE]). Le DBN comprend deux doigts de zinc, le premier est impliqué dans la spécificité vis à vis du GRE et le second est responsable de l'interaction avec les séquences d'ADN et la dimérisation du récepteur (28-29).
- Un domaine C-terminal ou ligand Binding Domain (LBD) correspond au site de fixation à l'hormone. Il est constitué de 220 à 250 aa. Cette région possède également un domaine d'activation de la transcription ou AF-2. Il comprend des séquences importantes participant à la dimérisation du récepteur, à sa translocation dans le compartiment nucléaire, à sa fixation aux HSP90 (heat shock protéin 90) et à son interaction avec les co-activateurs (19, 24).

Les RGs peuvent interagir entre eux, avec d'autres récepteurs nucléaires, ou des facteurs de transcription formant ainsi des homos ou des hétérodimères.

1.4.3 Mécanisme d'action des glucocorticoïdes : le devenir du complexe RG-GC

Le cortisol (chez l'homme), la corticostérone (chez les rongeurs) sont des structures lipophiles qui traversent passivement la membrane cytoplasmique. Les GCs se fixent et agissent principalement via des récepteurs intracellulaires. On en distingue deux types : les RGs et les récepteurs minéralocorticoïdes (RMs). Le RG lie le cortisol avec une affinité plus faible (K_d 2,5 -5 nM) comparée au RM qui lie le cortisol avec une affinité 10 fois plus importante (K_d 0,5- 1 nM). Cette règle ne s'applique pas aux GCs de synthèse, chimiquement modifiés pour être plus affins aux RGs. Théoriquement le cortisol inhibe toute possibilité d'activité de l'aldostérone (Ligand naturel du RM). D'une part, parce que le RM lie le cortisol et l'aldostérone avec la même affinité ($K_d=0.5nM$) (30-31), d'autre part, parce que la concentration plasmatique du cortisol est 100 à 1000 fois supérieure à celle de l'aldostérone. Ceci devrait conduire à une occupation permanente du RM par les GCs. Ceci est de fait évité

par des enzymes membranaires, les 11 β -Hydroxysteroïde déshydrogénases (11 β -HSD) qui contrôlent la liaison des GCs aux RMs.

La 11 β -HSD1 convertit la cortisone (biologiquement inactive) en cortisol (biologiquement actif), alors que la 11 β -HSD2 convertit le cortisol en cortisone (32). En effet, tous les tissus dits minéralosensibles expriment la 11 β -HSD2 qui joue un rôle déterminant dans l'accessibilité de l'aldostérone à son récepteur en transformant le cortisol en cortisone (33).

Comme nous l'avons déjà dit, le RG α est l'acteur principal des voies d'action des GCs (le RG β n'étant pas réactif avec les GCs). Il a une demi-vie de 20 à 30 heures qui est diminuée de moitié lorsqu'il est lié aux GCs (34). Le RG α sous sa forme non liée est localisé majoritairement dans le cytoplasme, il passe également dans le noyau grâce à des canaux qui rendent possible son mouvement entre ces deux compartiments cellulaires (35). Le RG α est associé à diverses protéines dites chaperonnes : ce sont les protéines du choc thermique (heat shock protéines [HSP]) dont les HSP 90, 70 et 50 et une immunophiline FKBP-59 (protéines aidant l'assemblage d'autres protéines) et une cyclophiline CYP40. Les HSP sont indispensables pour maintenir le RG α sous forme inactive en masquant deux séquences de localisation nucléaire (nuclear localization sequences [NLS]) : NLS1 et NLS2 qui se trouvent respectivement proches du DBD et dans le LBD du RG α . Les HSP sont aussi nécessaires pour la conformation de haute affinité du RG α et régulent sa fixation à son ligand. L'immunophiline, quant à elle, serait impliquée dans la stabilité et la régulation de la signalisation du RG α afin de prévenir une activation non spécifique du récepteur (25, 36).

1.4.3.1 La voie génomique dite « directe » des glucocorticoïdes

La fixation du GC sur le RG conduit à son hyper-phosphorylation (Activité kinase portée sur sa région de transactivation AF-1)(24) qui stabilise le RG et le protège de la dégradation, facilite son transport nucléo-cytoplasmique et son interaction avec la machinerie transcriptionnelle. L'interaction ligand/récepteur induit un changement de conformation du récepteur et sa dissociation du complexe protéique HSPs et immunophiline. Cette hypothèse est contestée par des études qui rapportent que les HSP, surtout HSP 90, sont nécessaires pour le transfert rapide des RGs vers le noyau. L'immunophiline contribuerait aussi à la connexion entre RG et les microtubules (35). La modification de la conformation du RG permet ensuite l'exposition du NLS en surface du DBD (initialement masqué). Le récepteur ainsi activé se transloque dans le noyau, se dimérise (en formant des homodimères ou des hétérodimères s'il s'associe aux RMs), recrute des cofacteurs qui facilitent ou bien s'opposent à la transcription.

Ensuite, il se fixe sur des séquences spécifiques de l'ADN appelées GRE (Glucocorticoids Responsive Elements) (37). Les GRE sont à proximité des promoteurs des gènes cibles. On en distingue deux types : le nGRE et le GRE. Le nGRE est un répresseur de la transcription des gènes. En l'absence de GC, le promoteur est activé par d'autres facteurs de transcription, mais quand le RG α est lié à son ligand, il est dimérisé, déplace les facteurs de transcription déjà présents pour se lier à l'ADN. Le nGRE confère au RG α une conformation inapte à activer la transcription, le promoteur devient par conséquent inactif.

Le GRE est la séquence activatrice de transcription des gènes, dans ce cas on aboutit à la synthèse des protéines responsables de l'activité physiologique des GCs.(38-39).

Il a été montré que les hétérodimères RG /RM pouvaient également activer le GRE avec une réponse propre, différente du couple classique RG/RG (40). Il est à noter que les dimères RG/RM ne lient pas exactement les mêmes gènes que les homodimères et il semblerait qu'ils régulent l'expression de certains gènes indépendants du GRE (41). Il est difficile d'évaluer *in vivo* l'importance physiologique de ces hétérodimères car leur formation est relative au taux des RG et RM et à la présence des facteurs protéiques qui favorisent leur interaction alors que ces paramètres varient en fonction du type cellulaire (42).

1.4.3.2 La voie non-génomique dite « indirecte » des glucocorticoïdes

De certains gènes, comme par exemple la sous unité α de la gonadotrophine et de l'ostéocalcine, qui utilisent le promoteur GRE pour initier leur expression, le RG α peut bloquer la transcription. Pour cela, il fait intervenir des interactions protéine-protéine ou bien l'encombrement stérique au sein des séquences d'ancrage des facteurs transcriptionnels. En effet, le chevauchement ou la proximité immédiate des sites de fixation pour le RG α et d'autres facteurs peuvent être à l'origine d'une diminution de la transcription. Ainsi le RG α activé empêcherait la transactivation de l'expression de ce type de gènes (43). Il existe aussi des mécanismes de *compétition* au niveau du GRE qui ne peut fixer qu'un seul facteur de transcription. C'est le cas de la prolactine et du collagène dont la transcription est inhibée par le complexe RG /GC qui déplace leur facteur de transcription AP-1(Activated Protein-1) du GRE. Ce phénomène est également observé au cours de l'action anti-inflammatoire des GC où le RG α réprime les gènes de nombreux médiateurs inflammatoires qui sont sous contrôle des facteurs de transcription NF κ B (*Nuclear Factor kappa B*) et AP-1, eux-mêmes étant activés par des stimuli pro-inflammatoires (44). Le RG α peut aussi participer à des processus de transrépression via

une interaction **protéine-protéine** entre les facteurs impliqués dans la transcription des gènes et le $RG\alpha$ activé au sein du cytoplasme. Cette interaction purement physico-chimique a été largement documentée entre $NF\kappa B$ et le complexe $RG\alpha/GC$. Elle met en jeu la sous-unité $Re1A$ de $NF\kappa B$ et le domaine en doigt de zinc du $RG\alpha$ (45-46). Parallèlement, le couple $RG\alpha/GC$ induit une augmentation de la synthèse de $I\kappa B\alpha$, répresseur de $NF\kappa B$, empêchant ainsi la translocation nucléaire de celui-ci et la production des facteurs de l'inflammation (25, 47).

1.4.3.3 La voie non génomique « rapide » des glucocorticoïdes

L'acheminement des événements induits par les GCs par les voies génomiques est relativement long. La translocation nucléaire dure de 10 à 30 min, la transcription et la traduction nécessitent environ 120 min. ce qui ne permet pas d'expliquer les effets quasi-instantanés (de l'ordre de la seconde à la minute) des glucocorticoïdes dans certains cas. Des équipes ont montré que ce délai d'action court peut être expliqué par des mécanismes d'action indépendants du génome. La majorité des mécanismes d'action non génomiques des GCs relèvent de la présence de RGs membranaires. L'insertion transmembranaire de ces derniers semble être assurée par des calvéolines et les radeaux lipidiques ou Rafts (48-49). Une fois fixés par les glucocorticoïdes, les RGs induisent l'activation de protéines intracellulaires (G-proteins, cAMP-protein Kinase (PKA), l'extracellular signal-regulated kinase (ERK)), à l'origine de l'action biologique rapide (50-51). (Figure 8)

En outre, des études récentes *in vitro* ont montré que les GCs à fortes doses étaient capables de se lier aux lipides des membranes synaptiques et de moduler leur liaison avec les protéines ou bien d'activer des canaux voltage-dépendants sans l'intervention d'aucun récepteur, uniquement par une simple modification des propriétés physicochimiques de la membrane (52-54).

Les GCs sont souvent utilisés pour le traitement rapide des désordres vasculaires (choc anaphylactique, vascularites, etc.). Les mécanismes non génomiques responsables de la modification de la perméabilité des vaisseaux, vasoconstriction, et de l'adhésion des cellules immunitaires sont encore inconnus. Bien que très largement utilisés en pratique clinique, les mécanismes d'action des glucocorticoïdes ne restent encore que partiellement compris.

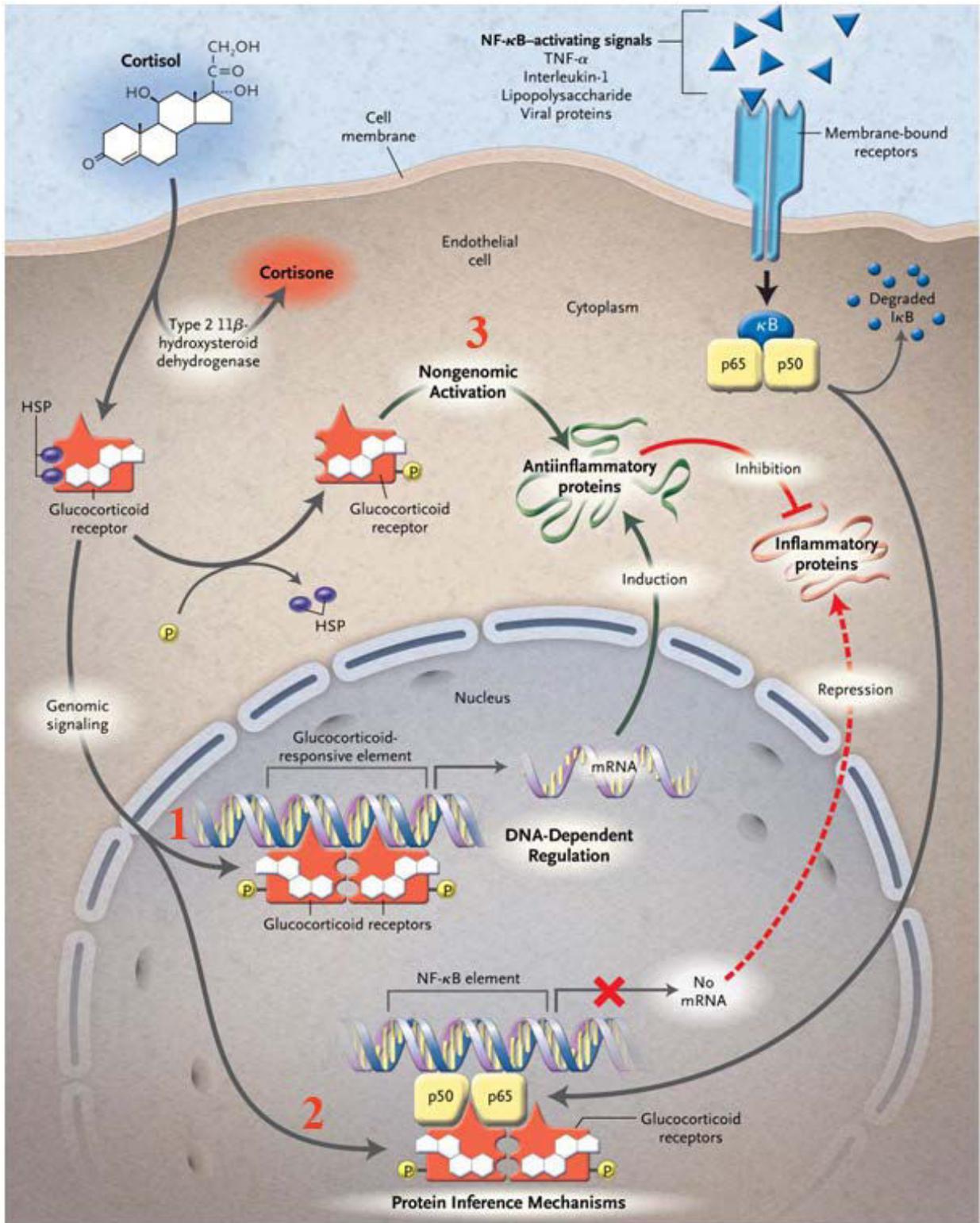


Figure 8: Mécanisme d'action du cortisol (D'après Rhen et al, 2005). **1** : voie génomique directe, **2** : voie génomique indirecte et **3** : voie non génomique.

1.5 La pharmacodynamie des glucocorticoïdes

Le cortisol, chef de file naturel des glucocorticoïdes, contrôle un grand nombre de fonctions dans l'organisme, pratiquement dans tous les tissus, grâce à la répartition ubiquitaire de son récepteur (55).

De leur origine, le cortisol endogène, les GCs de synthèses gardent des propriétés hormonales, qui sont résiduelles par rapport au cortisol, mais non négligeables en traitements prolongés. Seuls les tissus minéralosensibles, comme les reins, font exception à la règle, puisque les GCs n'y produisent que peu d'effets.

1.5.1 L'action sur le développement embryonnaire

Le cortisol fœtal provient du sang maternel via le placenta qui contrôle rigoureusement la cortisolémie du fœtus. La concentration du cortisol est contrôlée par la 11 β HSB2 placentaire qui joue un rôle clé en transformant le cortisol en cortisone (biologiquement inactif), limitant ainsi l'excès d'exposition fœtal aux GCs (56).

Les récepteurs des GCs sont exprimés dans tous les tissus fœtaux, y compris le placenta, dès la 8^{ème} semaine de gestation. L'implication des GCs dans la différenciation et la croissance embryonnaires intervient précocement et se poursuit jusqu'à la fin de la gestation. Les GCs, en association avec d'autres hormones (IGF: insulin-like growth factors, hormones thyroïdiennes, insuline), contribuent au développement et à la maturité de la majorité des organes : les poumons, le foie, les reins et le système nerveux central (57-58).

1.5.2 Les actions métaboliques des glucocorticoïdes

1.5.2.1 Le métabolisme glucidique

Les GCs prennent part au maintien de l'homéostasie des glucides ce qui est fondamental pour les fonctions glucodépendantes du cerveau et du cœur. Ils contrôlent subtilement la glycémie par le stockage du glucose sous forme de glycogène qu'ils utiliseront par la suite pour rétablir une glycémie normale.

Les GCs induisent une élévation de la glycémie, d'une part, par la stimulation de la synthèse du glucagon et donc la stimulation de la glyco-génolyse (59) et d'autre part, ils réduisent le nombre et l'activité des cellules β pancréatiques (60). Ils inhibent la sécrétion de l'insuline et diminuent l'activité des récepteurs de cette hormone, ce qui diminue la consommation

périphérique du glucose. Cette hyperglycémie a pour conséquence une intolérance cellulaire au glucose d'où la survenue fréquente du diabète cortisonique (61).

1.5.2.2 Le métabolisme protéique

Le catabolisme azoté induit par les GCs va de pair avec la glycogénèse. En effet, ils induisent la protéolyse en activant une protéase myofibrillaire. Les acides aminés ainsi libérés sont ensuite intégrés dans la néoglucogénèse. Tous les tissus de l'organisme sont concernés par ce catabolisme, en particulier : les muscles, la peau, le tissu osseux, ce qui peut expliquer les myopathies, les vergetures, l'ostéoporose consécutives à l'hypercorticisme prolongé (62).

1.5.2.3 Le métabolisme lipidique

Les GCs sont des hyperlipémiants, ils catalysent la lipolyse indirectement en augmentant la sensibilité du tissu adipeux aux agents lipolytiques (catécholamines, glucagon ou hormone de croissance). En synergie avec ces hormones, les GCs occasionnent la libération du glycérol, une hypercholestérolémie, une élévation de la fraction de LDL (Low Density Lipoprotein) et l'accroissement du taux des acides gras. Cette hyperlipémie constitue une source d'énergie pour l'organisme et diminue l'utilisation du glucose (63).

L'imprégnation par les GCs est caractérisée par une modification de la répartition des tissus adipeux avec une délocalisation de la graisse de réserve musculaire pour une localisation Facio-tronculaire caractéristique du « faciès Cushingoid ».

1.5.2.4 Le métabolisme de l'eau et des électrolytes

Les minéralocorticoïdes agissent sur le tube distal et collecteur du rein où ils régulent des canaux et pompes ioniques tels que le canal sodique ENaC et la pompe NaKATPase, permettant la réabsorption du sodium et l'excrétion de potassium (64). Le cortisol a le même effet mais plus modéré. En revanche, certains GCs de synthèse peuvent produire l'effet inverse en facilitant l'élimination sodée. Cette action des GCs sur l'équilibre hydroélectrolytique explique les effets secondaires au niveau cardiovasculaire de la corticothérapie à long terme (Hypertension volume-dépendante), et d'autant plus, les répercussions sévères de l'hypocorticisme sur le système vasculaire avec une réduction de la volémie, une augmentation de la viscosité du sang, une hypotension, etc (65).

1.5.2.5 Le métabolisme phosphocalcique

Par leur action anti vitamine D les GCs diminuent l'absorption intestinale du calcium. Au niveau rénal, ils favorisent l'élimination urinaire de calcium et de phosphore entraînant un bilan phosphocalcique négatif. L'hypercalciurie entraîne le risque de formation de lithiase rénale.

1.5.3 L'activité anti-inflammatoire des glucocorticoïdes.

L'inflammation est un mécanisme de défense naturel qui répond aux agressions intra et extracellulaires. Elle peut avoir de nombreuses origines (traumatisme, agression physique ou chimique, infectieuse, défaillance immunitaire) et se déroule schématiquement en quatre étapes.

La première étape commence par la reconnaissance de l'agent pathogène et la signalisation de sa présence à l'organisme.

La deuxième étape est la *phase vasculaire*, elle est caractérisée par une vasodilatation, une augmentation du flux sanguin, un accroissement de la perméabilité vasculaire. Il en résulte un œdème interstitiel (exsudat), un gonflement et une douleur. A ce stade de l'inflammation, il y a libération des médiateurs chimiques de l'inflammation (kinines, facteur du complément, prostaglandines, histamine, leucotriènes, etc.).

La troisième étape dite *cellulaire* est plus retardée. Elle se traduit par le recrutement des leucocytes dans le foyer inflammatoire par chimiotactisme. Les polynucléaires neutrophiles arrivent en premier, suivis des macrophages. Ils ont pour mission l'ingestion de l'agent pathogène et sa destruction grâce à leurs enzymes protéolytiques et hydrolytiques.

La quatrième étape est la phase de mise à terme du processus inflammatoire ou la phase de réparation. La migration et la prolifération des fibroblastes assurent la synthèse du collagène et des mucopolysaccharides, les constituants de la trame du nouveau tissu conjonctif. Progressivement la production des médiateurs disparaît et la circulation locale reprend son cours normal. L'évolution se fait soit vers la mémoire immunitaire ou à l'inverse vers une chronicité (66-67). Les quatre étapes peuvent être différées ou concomitantes.

Les GCs sont considérés comme les agents anti-inflammatoires les plus puissants et ce depuis leur première utilisation thérapeutique, d'où leur large utilisation dans le traitement de diverses pathologies. De façon générale, les GCs s'opposent aux signes prémonitoires de l'inflammation, l'œdème et la sensation de chaleur et douleur. Ils limitent la vasodilatation, la

perméabilité vasculaire et tarissent l'action des médiateurs solubles et cellulaires de l'inflammation.

1.5.3.1 Les médiateurs cellulaires de l'inflammation

Les cellules de l'inflammation comprennent les cellules de l'endothélium des vaisseaux, les lymphocytes, les polynucléaires neutrophiles, les macrophages, les polynucléaires éosinophiles et basophiles, les mastocytes et les fibroblastes.

1.5.3.2 Les médiateurs chimiques de l'inflammation

De multiples médiateurs chimiques provenant du plasma ou des cellules, interviennent à tous les stades de l'inflammation. Un grand nombre de ces médiateurs est synthétisé de *novo* en réponse à des stimuli via des facteurs de transcriptions cellulaires. Parmi ces derniers AP-1 (Composé de c-Jun et Fos) et NF κ B ont été impliqués dans l'inflammation suite à la découverte de leurs sites d'insertion dans les promoteurs de nombreux gènes impliqués dans le processus inflammatoire.

Une fois activés, AP-1 et NF κ B assurent l'expression d'un nombre considérable de médiateurs de l'inflammation, entre autres: IL1, IL2, IL3, IL6, IL8, l'interféron β , le TNF α , IFN- γ , GM-CSF, TGF- β , facteur du complément, MIP, RANTES, COX-2 et les molécules d'adhésions(35).

Brièvement, le NF κ B quiescent est associé à son inhibiteur I κ B dans le cytoplasme. Les inducteurs de l'inflammation déclenchent une cascade de signalisation et activent l'I κ B kinases. Cette enzyme provoque l'ubiquitination d'I κ B, la libération de NF κ B qui se transloque dans le noyau pour induire la transcription des gènes cibles. De la même façon, la voie de la *c-Jun N-terminal kinases (JNK)* stimule la production des médiateurs inflammatoires. La JNK est une kinase ubiquitaire particulièrement impliquée dans les états d'inflammations et de stress cellulaire. Son activation induit sa migration vers le noyau où elle phosphoryle le facteur de transcription AP-1 (68). AP-1 phosphorylé va se fixer sur son promoteur sous forme d'hétérodimères c-Jun/Fos et orchestrer la transcription de la majorité des gènes inflammatoires (25, 46, 69).

1.5.3.3 Action des GCs sur les médiateurs cellulaires

Au niveau de l'endothélium vasculaire, les GCs réduisent l'expression des molécules d'adhésion comme ICAM-1, V-CAM, CD44 ce qui interfère avec la diapédèse des

leucocytes (70-71). Ils inhibent la transcription de « la nitrite oxyde synthétase inductible (iNOS) » qui produit le monoxyde d'azote, un puissant vasodilatateur.

Les GCs induisent la synthèse de la vasocortine et de la vasoréguline, la première est capable d'inhiber la formation de l'œdème expérimental provoqué par le dextran et la seconde arrête la formation de l'œdème en stimulant la synthèse de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II et donc la vasoconstriction (72-74). Par leur action sur les cellules endothéliales, les GCs réduisent la vasodilatation et la perméabilité vasculaire.

Les GCs inhibent l'infiltration des macrophages et des polynucléaires neutrophiles (PMN) dans le site de l'inflammation par plusieurs mécanismes. Ils empêchent l'entrée du glucose dans ces cellules et réduisent ainsi leur locomotion. Ils inhibent également les systèmes d'oxydoréductions des cellules aboutissant d'un côté, à la diminution de la capacité phagocytaire des leucocytes, et d'un autre côté, en déstabilisant la membrane lysosomale, ils bloquent la libération des protéases, des cathepsines, et d'autres enzymes amplificateurs de l'inflammation. La baisse du chimiotactisme et de l'adhésion des macrophages et des PMN sur les cellules endothéliales sont d'autres mécanismes par lesquels les GCs déjouent leur afflux dans le foyer inflammatoire (66-67).

Les GCs diminuent le nombre des éosinophiles, basophiles et mastocytes. Ils provoquent une inhibition de la libération d'histamine dépendante des IgE, de la libération des leucotriènes C4 par les basophiles et freinent la dégranulation des mastocytes(71).

Les lymphocytes T sont les plus diminués sous l'action des GCs et leurs réponses aux stimuli antigéniques sont altérées par diminution de la production et de l'action des cytokines, notamment d'IL-2. Les GCs induisent leur apoptose.

Les lymphocytes B exposés aux GCs meurent également par apoptose (75), même s'ils sont plus résistants à l'action des GCs que les lymphocytes T.

Au stade tardif de la réaction inflammatoire les GCs affectent la prolifération des fibroblastes et la synthèse des précurseurs du collagène (procollagène I et III). Ceci peut expliquer le retard de cicatrisation constaté avec les GCs et leur prescription dans les maladies chroniques sclérosantes (71, 76).

1.5.3.4 Action des GCs sur les médiateurs chimiques

Le fort pouvoir anti-inflammatoire des GCs s'étend aussi sur les facteurs solubles.

Un grand est le nombre d'études qui rapportent que l'effet anti-inflammatoire des GCs résulte principalement d'une action indirecte via le blocage des facteurs de transcription des protéines de l'inflammation. L'élément de transrépression des GCs (nGRE) n'a jamais été identifié dans le promoteur des cytokines, ce qui écarte l'hypothèse d'une inhibition de la transcription par action directe sur les gènes (77).

Le $RG\alpha$ activé entrave la production des médiateurs solubles par AP-1 et NF κ B soit par une interaction protéine-protéine au niveau du cytoplasme, soit par une complétion, emportée par le couple $RG\alpha$ -ligand, au niveau du site d'insertion à l'ADN (voir la partie 4.1.5. C la voie génomique indirecte des GCs). Le complexe $RG\alpha$ /GC entretient l'état inactif de NF κ B en induisant l'expression d'I κ B. Ceci conduit à la répression de la transcription de COX-2 et à la dégradation de son ARNm. En revanche, l'inhibition de la COX-2 n'est obtenue qu'aux doses supraphysiologiques in vitro (77).

Les GCs stimulent la synthèse de protéines anti-inflammatoires telles que Secretory leukoprotease inhibitor (SLPI), IL-10, annexine-1 (lipocortine-1), *Mitogen activated protein kinase phosphatase1* (MAPK phosphatase1) qui vont agir sur les acteurs de l'inflammation aux différents stades du processus (78). Par exemple : la MAPK phosphatase 1 va déphosphoryler et inactiver JNK, amenant ainsi à la suppression de l'activité transcriptionnelle du complexe AP-1 (68).

L'activité anti-inflammatoire des GCs est donc très puissante, à la fois précoce et tardive. Ils impactent les événements moléculaires associés à l'activation des cellules endothéliales et leur fonctionnement et, par ces effets, diminuent la perméabilité vasculaire et la vasodilatation.

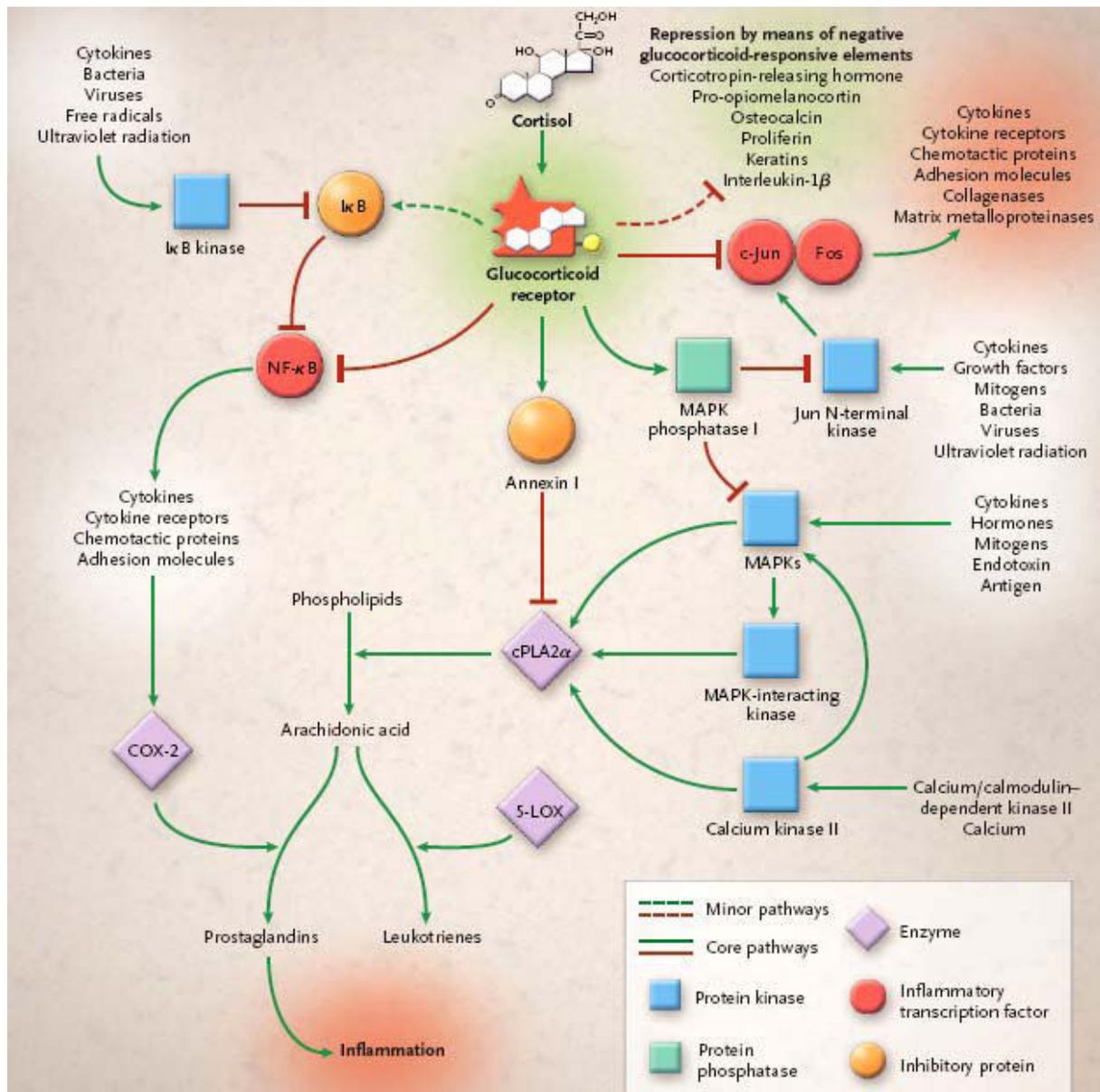


Figure 9: Schéma récapitulatif des voies de signalisations intracellulaires induites par les GCs. (D'après Rhen et al, 2005).

1.5.4 L'activité anti-immuno-allergique des GCs.

L'action immunosuppressive des GCs est liée à leur action anti inflammatoire sur les lymphocytes. Les GCs diminuent l'expression des molécules d'HLA inhibant ainsi la présentation de l'antigène par les lymphocytes T, ils diminuent également la multiplication des lymphocytes T à travers leur action sur l'IL2.

La réaction allergique résulte de la fixation des IgE activées par leurs allergènes sur des récepteurs spécifiques exprimés par les mastocytes et les basophiles. Une série de réactions initiées par la dissociation du phosphatidyl-inositol diphosphate intramembranaire aboutit à la libération des médiateurs de l'allergie : histamine, sérotonine, leucotriènes. Les GCs par le

blochage de cette dissociation stoppent la réaction allergique. L'efficacité des GCs dans le traitement des grandes manifestations allergiques est rapide et spectaculaire à tel point que leur administration à des fortes doses par voie intraveineuse est incontestable pour la prise en charge des chocs anaphylactiques (79).

1.5.5 L'action antiangiogénique des GCs

L'implication des GCs dans l'angiogenèse n'est pas négligeable sur le plan physiologique, pathologique et thérapeutique. De nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes par lesquels les GCs, inhibent la formation des néovaisseaux. Il a été montré que l'interaction de GCs avec leurs récepteurs induisait l'expression de la Thrombospondine-1, un puissant antiangiogénique. Ils réduisent également la synthèse du VEGF, un facteur proangiogénique ainsi que de son récepteur cellulaire. Ainsi, le traitement des tumeurs xénogreffes par la Dexaméthasone a induit, par la transrépression de l'expression du VEGF et IL8, la diminution de la densité des capillaires autour de la tumeur (80-81).

Les GCs provoquent également la diminution de l'expression des molécules d'adhésion cellulaire, une augmentation de l'expression des métalloprotéases, la destruction de la matrice extra cellulaire, une modification du réseau d'actine et des microtubules déjà existants. L'ensemble inhibe le processus de l'angiogénèse (82).

1.5.6 La toxicité des glucocorticoïdes (effets secondaires)

L'éventail d'action très large des GCs comporte des risques non négligeables et des dangers réels. La toxicité des GCs peut toucher la majorité des tissus de l'organisme et perturber de nombreuses fonctions physiologiques. Leurs effets secondaires sont corrélés à la durée du traitement, aux doses administrées, à l'âge, au sexe et aux sensibilités interindividuelles. De manière générale ce sont les cures prolongées de GCs qui induisent les répercussions les plus marquées sur l'organisme.

- **1.5.6.1 Les effets toxiques sur les glandes endocrines.**

La fonction surrénalienne

L'insuffisance surrénalienne est une complication inéluctable des corticothérapies prolongées à doses supra-physiologiques. Elle résulte du feedback négatif induit sur les cellules de la corticosurrénale et de la destruction progressive jusqu'à l'atrophie des cellulaires fasciculaires ou réticulaires. Vu l'importance vitale des GCs, les conséquences de cette inhibition sont parfois fatales (21, 67).

D'autres systèmes endocriniens

La sécrétion des hormones thyroïdiennes et de la prolactine est inhibée par les GCs. Ils abaissent également la sécrétion de la testostérone ainsi que les stéroïdes féminins (progestérone et œstrogène) ce qui se traduit par une impuissance chez les hommes et une perturbation du cycle menstruel voir même des aménorrhées chez les femmes. Enfin les GCs agissent sur les cellules pancréatiques pour un effet anti-insuline (67).

- **1.5.6.2 Les effets toxiques sur le tissu osseux**

L'ostéoporose est une rançon obligatoire de la corticothérapie à long terme et parfois selon les facteurs associés, à moyen terme. Elle résulte de la diminution de l'absorption digestive du calcium et la vitamine D, la réabsorption tubulaire du calcium, la diminution de l'activité ostéoblastique et de l'augmentation de la synthèse de l'ostéocalcine. Chez l'enfant, les GCs ralentissent la maturation osseuse et retardent la croissance (17, 83).

- **1.5.6.3 Les effets toxiques sur le métabolisme**

Métabolisme énergétique

Les Glucides : Les GCs sont hyperglycémisants et diabétoènes. En revanche ils s'opposent à l'utilisation périphérique du glucose par un mécanisme de résistance à l'insuline.

Les protides : Les GCs inhibent l'incorporation des acides aminés dans les protéines donc favorisent le catabolisme protéique. Les fontes musculaires sont une conséquence fréquente du catabolisme azoté cortisonique.

Les lipides : Sur le plan biologique les GCs induisent une lipolyse se traduisant par une hypertriglycémie, hypercholestérolémie et une augmentation du ratio LDL/HDL favorisant ainsi leur profil thrombogène (83).

Métabolisme hydro-électrolytique

La corticothérapie prolongée expose à une rétention hydro-sodée par la stimulation de la réabsorption tubulaire distale de sodium et d'eau au détriment du potassium et des protons. L'importance de cette action dépend des GCs employés de leur posologie, elle est intense avec les GCs naturels comme l'hydrocortisone et minime avec les dérivés fluorés et méthylés du cortisol.

- **1.5.6.4 Les effets toxiques en ophtalmologie**

Le glaucome, est une complication fréquente de la corticothérapie locale. Les GCs augmentent la pression intraoculaire en diminuant l'écoulement de l'humeur aqueuse à travers le trabeculum uvéoscléral. L'évolution du glaucome cortisonique est imprévisible, plutôt rapide (2 à 3 semaines) et réversible avec l'arrêt du traitement, mais le risque de réapparition subsiste à chaque réintroduction du traitement. Tout glucocorticoïde provoque une hypertonie oculaire, d'autant plus lorsque son pouvoir anti-inflammatoire est plus important.

La cataracte est une opacification du cristallin dont les mécanismes physiopathologiques restent encore mal élucidés. C'est surtout une cataracte postérieure sous capsulaire qui s'installe progressivement avec l'administration systémique de fortes doses de GCs mais essentiellement avec les préparations corticostéroïdes à usage ophtalmologique local(83). Une fois induite son évolution est irréversible même après arrêt de la médication.

A coté de ces deux principales complications oculaires de la corticothérapie, des proliférations virales, mycosiques et des troubles trophiques ont été également observés (67).

1.6 Le développement des médicaments anti-inflammatoires en ophtalmologie.

En dépit de l'efficacité des glucocorticoïdes dans toutes les approches thérapeutiques anti-inflammatoires, leurs effets secondaires ont soulevé beaucoup de doutes quant à leur toxicité sur les tissus oculaires surtout lors de l'administration locale dans l'œil. Face à ce problème les laboratoires pharmaceutiques travaillent activement pour développer des alternatives thérapeutiques afin de mettre à la disposition des ophtalmologues et des patients des molécules pouvant satisfaire les attentes thérapeutiques avec moins d'effets secondaires. Parmi les molécules en développement préclinique et clinique à visées anti-inflammatoires, le XG-102 (appelé aussi D-JNKI-1) semble être un bon futur candidat-médicament dans l'inflammation oculaire.

En effet, parmi toutes les stratégies anti-inflammatoires en développement, les inhibiteurs de c-Jun N-terminal kinases (JNK) ont montré et continuent à prouver leur efficacité dans divers modèles d'inflammation (84-87). XG-102, un peptide de 29 acides aminés, est le premier produit de synthèse chimique qui a montré sa grande spécificité à inhiber, *in vitro* et *in vivo*, la voie des kinases JNK connue pour son rôle amplificateur de l'inflammation *via* la phosphorylation de la protéine c-Jun du complexe AP-1(décrit en introduction) et inducteur de cytotoxicité et d'apoptose dans les cellules(88-89).

De plus, XG-102 est formé de la combinaison d'une séquence consensus composée de 19 acides aminés permettant son ancrage à JNK avec un TAT-peptide (10 acides aminés) du VIH permettant son passage à travers les membranes plasmiques(90).

Encore, la structure D-retro-inverso (Obtenue par la substitution d'un D-acide aminé) de cette petite protéine chimérique lui confère une grande résistance à la dégradation par les protéases et donc une demi-vie d'action relativement longue (91).

Enfin, ces dernières années, XG-102 a démontré un bénéfice clinique et préclinique, sans effets secondaires indésirables dans plusieurs maladies dégénératives telles que la perte traumatique de l'audition, la colite, le diabète, l'ischémie myocardique, et d'AVC ischémique (92-93).

2 L'œil

L'œil est l'organe responsable de la vision, il transforme un signal lumineux en un signal électrique pour le véhiculer au cerveau via le nerf optique. Le fonctionnement de l'œil peut être assimilé à celui d'une caméra dont la complexité et la performance dépassent largement les appareils optiques les plus modernes. La vision est un processus complexe qui met en œuvre une chaîne d'éléments optiques et nerveux, de la cornée au cortex cérébral.

2.1 Anatomie générale de l'œil

Chez l'Homme, le globe oculaire a une forme sphérique, un diamètre moyen de 24 à 25 mm et pèse environ 7 grammes. Encastré dans une orbite osseuse, il ne laisse apparaître qu'un sixième de sa surface. L'œil est bien isolé de la circulation générale par la présence de la barrière hématorétinienne extrêmement sélective au passage des molécules véhiculées par le sang. Il est divisé en deux segments anatomo-fonctionnels : le segment antérieur et le segment postérieur (Figure 10).

Dans les parties suivantes nous allons aborder avec plus de détail les structures du segment postérieur, surtout la rétine, compte tenu de son étroite relation avec nos recherches :

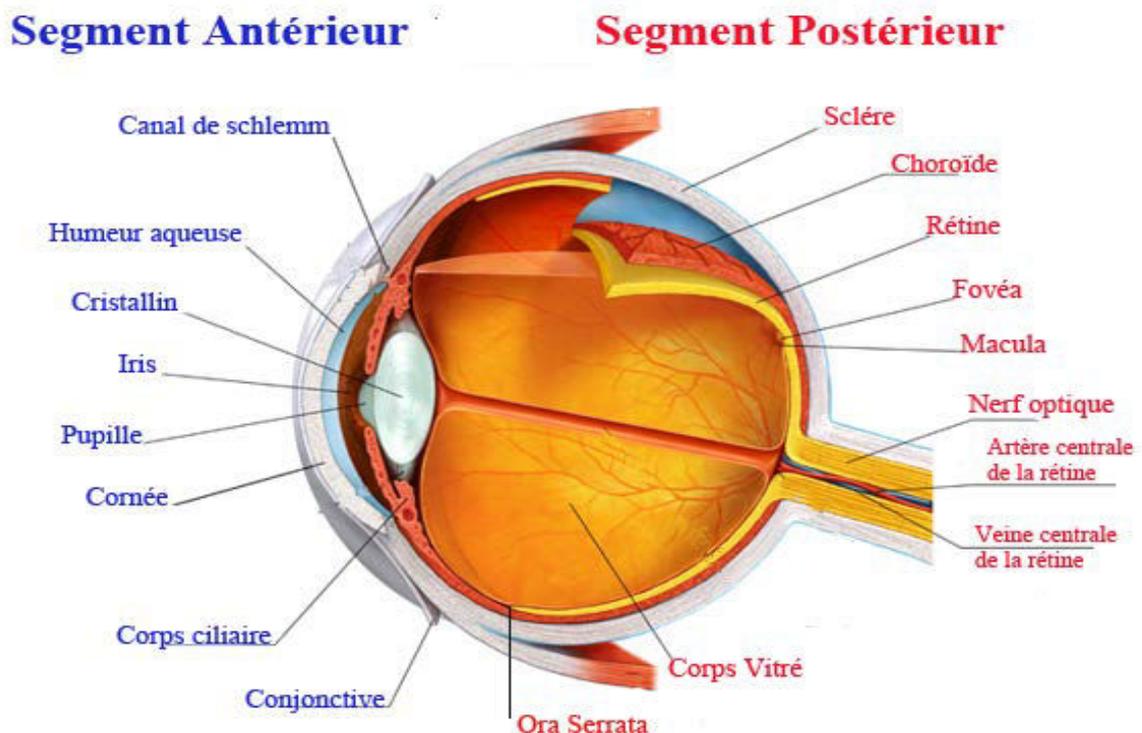


Figure 10: Anatomie générale du globe oculaire. (Brussels Retina © 2013).

2.1.1 Le segment antérieur

C'est la partie émergente de l'œil. Il est facilement accessible aux traitements chirurgicaux (cataracte, laser myopique, greffe) et médicamenteux (collyre, pommade). Il est formé de différentes structures :

2.1.1.1 La cornée est le prolongement antérieur de la sclère « le blanc de l'œil », une membrane rigide constituée essentiellement de fibres de collagène et de fibroblastes. Dans les conditions normales elle est avasculaire et totalement transparente, elle joue le rôle de la première lentille optique de l'œil. Elle a un grand pouvoir de convergence qui peut atteindre 40 dioptries. C'est une zone très innervée sensible au moindre contact.

2.1.1.2 L'iris est formé d'une superposition de couches cellulaires; il est richement vascularisé et innervé par des fibres nerveuses stimulant les muscles et les sphincters qui contrôlent la dilatation et la constriction de la pupille, c'est le diaphragme de l'œil. Grâce à sa pigmentation l'iris définit la couleur des yeux.

2.1.1.3 Le corps ciliaire est une structure vasculaire composé de capillaires fenestrés de grande taille qui laissent diffuser les molécules et les cellules dans le stroma ciliaire. Il participe à la sécrétion de l'humeur aqueuse, la régulation de la pression intraoculaire et l'accommodation. L'épithélium non pigmenté du corps ciliaire et l'endothélium des vaisseaux iriens constituent la barrière hémato-aqueuse (94)

2.1.1.4 L'humeur aqueuse est un liquide qui remplit la chambre antérieure, l'espace entre la cornée et le cristallin. Elle est continuellement renouvelée par le corps ciliaire et drainée par le trabeculum. Elle contribue au maintien de la pression intraoculaire à 15 mm Hg (95).

2.1.1.5 Le cristallin est la deuxième lentille de l'œil, il est flexible, biconvexe, convergent, couvert d'une capsule acellulaire. Les cellules qui constituent le cristallin sont très particulières, car dépourvues de noyau et d'organites.

Le pouvoir accommodateur de l'œil repose sur la capacité de déformation du cristallin élastique qui sous l'effet de la contraction du muscle ciliaire, focalise les rayons lumineux, sur la rétine. Avec l'âge, la perte de ce pouvoir d'accommodation est responsable de la presbytie.

2.1.2 Le segment postérieur

Anatomiquement le segment postérieur a une accessibilité thérapeutique restreinte, due à la présence de la barrière hématorétinienne, un véritable bouclier qui s'oppose au passage des substances véhiculées par la circulation sanguine (96).

2.1.2.1 Le corps vitré est un amas gélatineux qui remplit la cavité vitrénne assurant ainsi la rigidité de l'œil et le maintien de la rétine collée contre les parois du segment postérieur. Il est entourée d'une fine membrane, la hyaloïde, et représente un volume de 4 ml soit 80% du volume oculaire.

2.1.2.2 La rétine est une fine membrane tapissant la surface interne du globe, Elle s'étend de la papille à l'ora serrata (extrême périphérie de la rétine du côté nasal et temporal), de coloration rosée, transparente, bien vascularisée. L'anatomie de la rétine révèle la présence d'une zone rétinienne périphérique riche en photorécepteurs de type bâtonnets et une zone centrale plus concentrée en cônes. La zone centrale de la rétine comprend la *Macula lutea*, une zone avasculaire, macroscopiquement visible à l'examen de fond d'œil (tache jaune). Une dépression anatomique est observée au centre de la macula, la *Fovéa*, une zone de 500µm de diamètre, uniquement constituée de cônes. Située dans axe optique, la fovéa est responsable de la vision précise et de la distinction des couleurs, elle est considérée comme le site d'acuité visuelle maximale (Figure 11).

La rétine mature des mammifères est composée de deux tissus : La rétine neurale et épithélium pigmenté de la rétine (EPR).

Par l'intermédiaire de EPR (feuillet supportant la neurorétine) la rétine est fortement adhére à la choroïde alors que sa face interne est en contact avec le vitré via de la membrane hyaloïde.

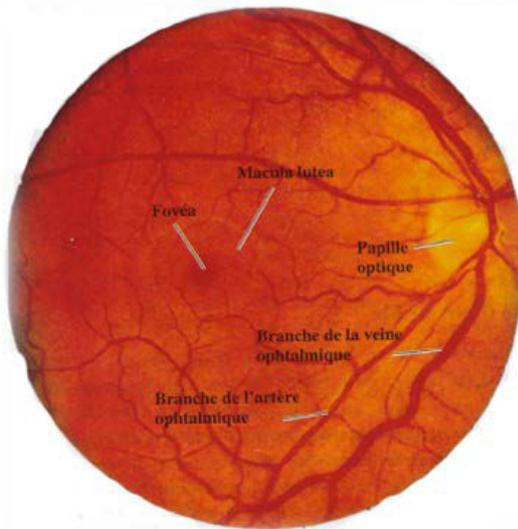
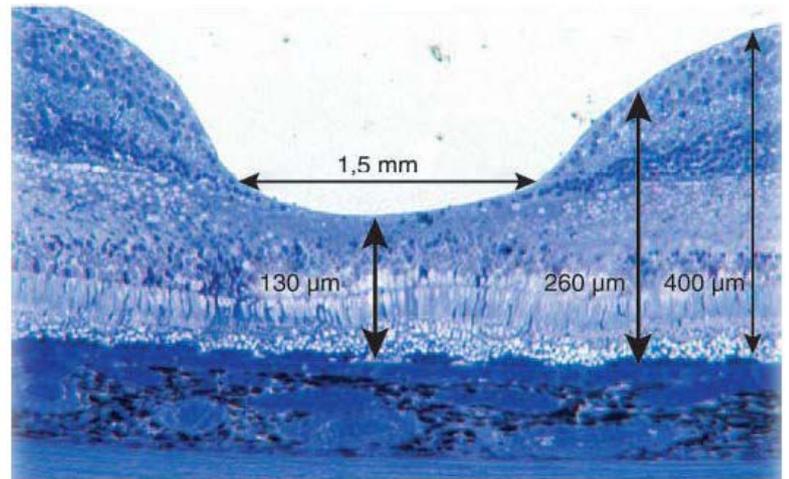
A**B**

Figure 11: Les zones anatomiques macroscopiques de la rétine visibles sur un fond d'œil et les caractéristiques histologiques de la rétine centrale. A) Photographies du fond d'œil où on distingue : la papille optique en position nasale (droite), la veine centrale avec un diamètre (100 à 125µm) supérieur à celui de l'artère centrale (80 et 100 µm). La *macula lutea* apparaît comme une zone de couleur jaune pâle, au cœur de laquelle se situe la fovea qui se positionne au centre de l'axe optique. B) Une coupe semi-fine d'une macula de primate, colorée au bleu de toluidine, détaillant la dépression centrale de la fovea et les différentes épaisseurs de la macula, des régions fovéolaire et péri-fovéolaires (D'après Behar-Cohen et al. 2009).

La structure de la neurorétine

La neurorétine est un tissu sensoriel capable de capter les rayons lumineux, de les convertir en influx nerveux et puis de transmettre cette information au système nerveux central. Elle dérive du tube neural. La densité, le type des cellules et l'aspect de la rétine varient de la zone centrale à la périphérie. Elle est composée de six types de cellules neuronales: cônes et bâtonnets, cellules horizontales, bipolaires, amacrines et ganglionnaires, et de trois types de cellules gliales : cellules gliales de Müller (CGM), astrocytes et cellules microgliales. Chacun de ces types cellulaires est localisé dans une couche rétinienne particulière. Du point de vue histologique la rétine est constituée de **dix couches cellulaires**. De l'extérieur vers l'intérieure on trouve :

L'épithélium pigmentaire de la rétine (EPR)

Sur le plan histologique, La monocouche cellulaire de l'EPR occupe une place stratégique entre les photorécepteurs et la choriocapillaire. En effet, en raison de ses propriétés physiques de barrière hématorétinienne, et ses propriétés optiques dans la phototransduction, mais surtout ses nombreuses activités métaboliques, son intégrité est fondamentale pour le fonctionnement normal de la rétine, notamment pour les photorécepteurs. L'EPR constitue la

partie la plus externe de la rétine. Il forme une couche unistratifiée, constituée de cellules hexagonales disposées en mosaïque régulière, contenant des mélanosomes à l'origine de sa pigmentation et reposant sur une membrane basale « la membrane de Bruch ».

Les cellules épithéliales sont au nombre de 4 à 6 millions pour l'ensemble de la rétine humaine ; elles présentent à la coupe, un aspect rectangulaire, certaines sont binucléées. Leur nombre et morphologie sont tributaires de leur âge et de leur localisation. Elles sont plus abondantes, longues (10-14 μ m) et hautes (14 μ m) dans la zone maculaire, alors qu'en périphérie, elles sont moins nombreuses plates et plus larges (60 μ m). La membrane plasmique des cellules de l'épithélium pigmenté présente de nombreuses villosités aux pôles apical et basal, qui permettent d'augmenter la surface d'échange métabolique et le transport ionique actif, respectivement, entre les photorécepteurs et l'EPR, et entre l'EPR et la choriocapillaire. La face latérale de la membrane plasmique est le siège de jonctions serrées qui assurent la liaison des cellules entre elles. On y trouve trois types de jonctions cellulaires : les *gap junctions* (Discontinues et perméables), les Zonulae adherens créant un espace intercellulaire de 200 à 300 Å (Angström= 0.1 nanomètre), et les Zonulae occludens (ZO) : zones de fusion des deux membranes adjacentes, imperméables, véritable siège de la barrière hématorétinienne externe qui empêche le passage passif des macromolécules entre la choroïde et l'EPR. Cet ensemble impose un transfert transcellulaire de la choriocapillaire vers les photorécepteurs et réciproquement.

Les propriétés fonctionnelles de l'EPR sont indispensables pour obtenir une vision normale. Si l'EPR est détruit les photorécepteurs et la choriocapillaire s'atrophient handicapant ainsi le processus visuel. Il a schématiquement quatre grands rôles

- Un Rôle d'écran opaque grâce à la densité des cellules contenant des grains de mélanines qui absorbent l'excès de photons projetés sur la rétine
- Un siège d'échanges hydro-électrolytiques : sodium, chlore, carbonate et potassium au niveau du pôle apical (rétinien) et basal (Choroïdien), d'oxygène, de nutriments par des phénomènes de transport passifs ou actifs. Le transfert des particules par l'intermédiaire de transporteurs a été décrit pour le glucose, le lactate, le GABA et les acides aminés.(96).
- Un rôle dans le stockage, mais surtout, dans le métabolisme des dérivés de la vitamine A grâce à une protéine microsomale, RPE65, exclusivement présente dans l'EPR. Il joue un rôle important dans la transduction du signal visuel puisqu'il constitue le site d'isomérisation du cycle des rétinoïdes. Brièvement, le **rétinal** (L'une des trois formes de la vitamine A) est

enmené depuis l'EPR jusqu'aux segments externes des photorécepteurs par des protéines de transport. Quand la lumière est absorbée dans un photorécepteur, les pigments visuels sont dégradés et le rétinol est converti en **tout-trans-rétinol**, qui réintègre l'EPR où il est isomérisé en **11-cis-rétinol** et oxydé en **11-cis-rétinal**. Cette isomérisation est à l'origine de l'influx nerveux par phototransduction (Figure 12).

- Enfin, la phagocytose des articles externes des photorécepteurs permet leur renouvellement en permanence. Chaque cellule de l'épithélium pigmentaire assure la régénéscence des articles externes de 30 à 40 photorécepteurs simultanément. Elle phagocyte jusqu'à 4000 disques par jour, soit plus de 100 millions sur une durée de vie de 80 ans. Les vésicules contenant les articles externes sont digérés par l'arsenal enzymatique des cellules de EPR, une partie du produit de dégradation est recyclée dans l'EPR tandis que les déchets sont acheminés vers la choroïde. Cette phagocytose, longtemps considérée comme limitée aux seuls bâtonnets, est également admise pour les cônes.

L'EPR sécrète de nombreux facteurs de croissance. (VEGF, FGF, IGF, etc), des cytokines ($TNF\alpha$, l' $IFN\gamma$ et les IL 1, 6, 8 et 10), ainsi que d'autres facteurs essentiels pour l'intégrité structurale de la rétine et de la choroïde (97-100). Il possède également une activité stéroïdogénique, il convertit la progestérone en cortisol grâce à la présence des enzymes (CYP11A1, CYP11B1, CYP17 et CYP21A2) participant à la synthèse des stéroïdes (101).

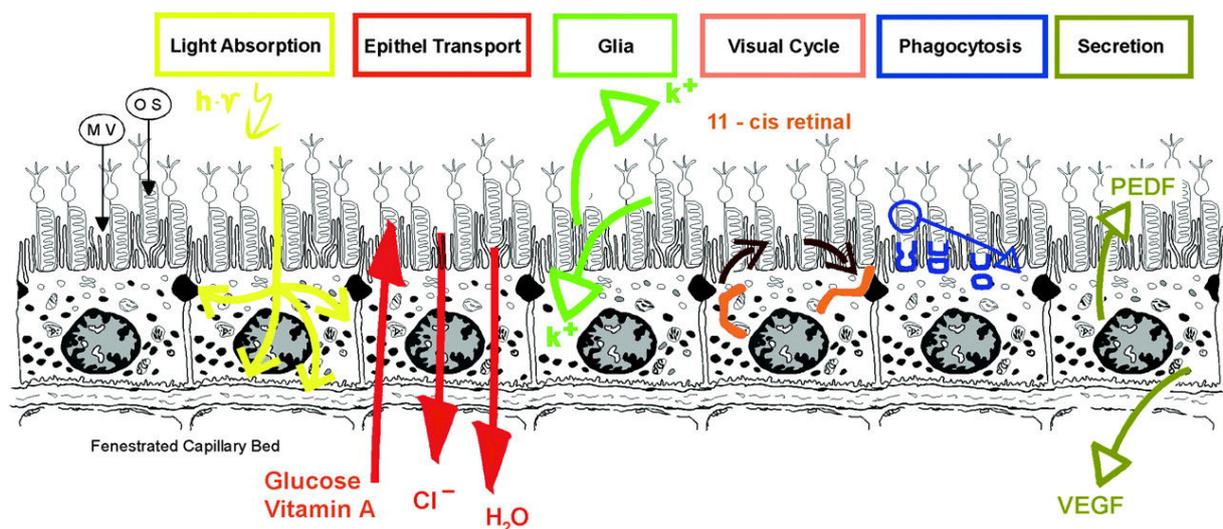


Figure 12: Résumé schématique des principales fonctions de l'épithélium pigmenté de la rétine. (D'après Strauss et al. 2005).

La couche des segments des photorécepteurs

Chez la plupart de vertébrés et chez l'Homme, on distingue deux types de cellules photoréceptrices, différenciées par leur forme et leur répartition dans la rétine : les cônes et les bâtonnets. Il existe un seul type cellulaire **de bâtonnets** : très sensibles à la lumière (un seul photon peut suffire à stimuler un bâtonnet) ils sont responsables de la vision nocturne, très abondants dans la rétine (environ 92 Millions chez l'Homme), leur répartition est périphérique à partir du centre de la fovéa. **Les cônes** sont représentés par quatre types cellulaires spécifiques aux couleurs détectées (bleu, vert, rouge et violet). Etant moins sensibles à la lumière, ils sont utilisés pour la vision diurne, ils sont beaucoup moins nombreux, mais très denses au niveau fovéolaire (96).

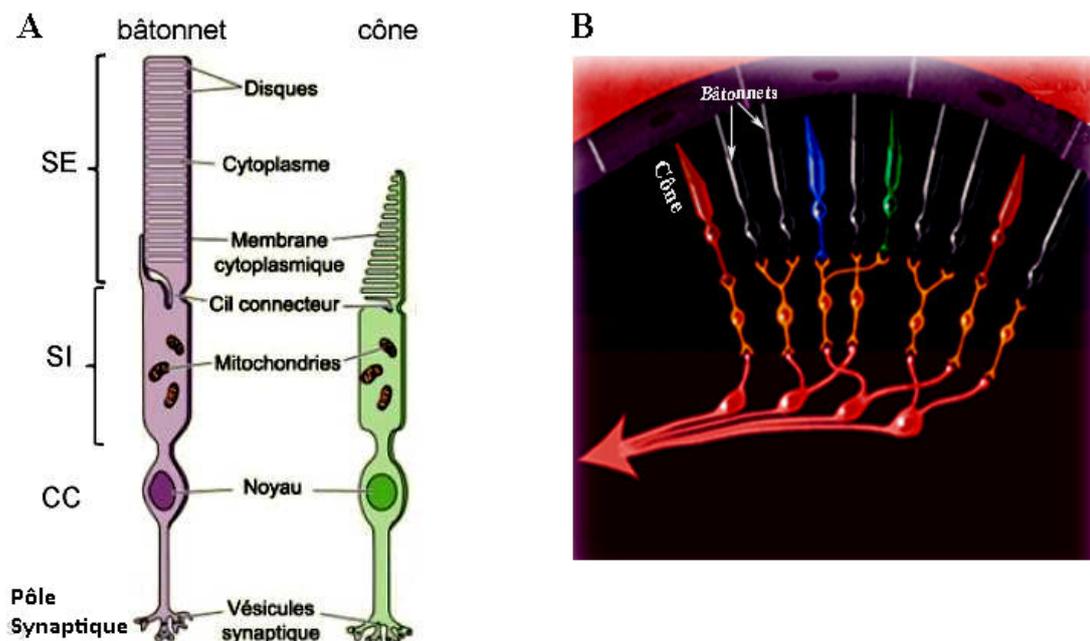


Figure 13 : Les propriétés morphologiques des photorécepteurs cônes et bâtonnets. A) schéma montrant les différences structurales entre les deux types de photorécepteurs qui sont constitués de quatre parties : **le segment externe (SE)**, la partie photosensible, sans cesse renouvelée et phagocytée par les cellules de l'EPR ; **le segment interne (SI)** qui contient les organites vitaux ; **le corps cellulaire (CC)** comprenant le noyau ; **la terminaison synaptique** qui contient des rubans synaptiques entourés de nombreuses vésicules (D'après Purves, 2005). B) Image représentant différents types cellulaires du photorécepteur cône et un seul type de bâtonnet (D'après la Communication de Gregory Hageman).

La membrane limitante externe

Ce n'est pas une véritable membrane mais plutôt une zone de connexion entre les cellules gliales de Müller et les segments internes des photorécepteurs, également des photorécepteurs entre eux par des systèmes de jonctions adhérentes et serrées.

La couche nucléaire externe(CNE)

Abrite les corps cellulaires des noyaux des photorécepteurs. Les noyaux des cônes sont légèrement plus gros et leur nombre est plus stable par rapport aux bâtonnets dont le nombre diminue avec l'âge.

La couche plexiforme externe(CPE)

Elle est constituée principalement des synapses entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires. Les prolongements cytoplasmiques des cellules de Müller et des cellules horizontales sont aussi retrouvés dans cette couche. Elle se situe à la jonction des deux systèmes vasculaires de la rétine: sa partie externe est sous la dépendance de la choriocapillaire, alors que sa partie interne dépend du réseau capillaire rétinien.

La couche nucléaire interne (CNI)

Elle contient les corps cellulaires de quatre types de cellules : Les cellules bipolaires, les cellules horizontales, les cellules amacrines et les cellules gliales de Müller. Les noyaux de ces dernières sont disposés en 4 à 10 couches (40µ d'épaisseur en moyenne). Cette épaisseur diminue de la périphérie vers le centre pour disparaître complètement au niveau fovéolaire.

- Les cellules bipolaires

Elles assurent la transmission de l'influx nerveux issu des photorécepteurs vers les cellules ganglionnaires. Elles procèdent des corps cellulaires avec un noyau arrondi. Elles forment la population neuronale majoritaire de la CNI.

- Les cellules horizontales

Ces cellules jouent un rôle important dans la diffusion et la modulation des influx nerveux. Leurs corps cellulaires se situent à la partie externe de CNI. Elles ont une forme souvent aplatie, elles envoient leurs dendrites et un axone long atteignant parfois 1mm dans la CPE.

- Les cellules amacrines

Comme les cellules horizontales, elles jouent un rôle d'association, leur corps cellulaire à noyau dentelé est situé dans la partie interne de la CNI.

- Les cellules gliales de Müller (CGM)

Les CGM représentent les principales cellules gliales de la rétine. Grâce leur grande taille (100µm) elles traversent radialement toute l'épaisseur de la rétine et sont en contact avec

toutes les cellules neuronales. Elles sont essentielles pour le soutien et la cohérence de la rétine sensorielle, surtout la couche fragile des photorécepteurs. Elles participent aussi au traitement et à l'acheminement de l'information visuelle (102).

Les CGM jouent un rôle pivot entre les neurones rétiniens et les compartiments avec lesquels elles échangent des molécules: les vaisseaux rétiniens, le vitré et l'espace sous-rétinien (Figure14). Ces cellules contiennent du glycogène, de nombreuses mitochondries et des filaments intermédiaires, immuno-positifs pour la vimentine et la protéine acide gliofibrillaire (GFAP: *Glial Fibrillary Acid Protein*).

- Les CGM approvisionnent les neurones en lactate et pyruvate importants pour leur métabolisme oxydatif et assurent l'élimination des déchets métaboliques. Ainsi, les neurotransmetteurs libérés par les neurones dans l'espace extracellulaire (acide gamma amino-butérique (GABA) et glutamate) sont internalisées par les CGM *via* des transporteurs de haute affinité. Les enzymes exprimées dans les CGM, la GABA transaminase et la glutamine synthétase, les transforment en glutamine, une substance non neuro-active qui sera recyclée par les neurones pour la synthèse de nouveaux neurotransmetteurs.

-Une des principales caractéristiques des CGM est leur conductance élevée vis-à-vis du potassium grâce à leurs canaux membranaires Kir4.1 (103), ce qui leur permet de tamponner *in situ* des concentrations extracellulaires élevées de potassium résultant de l'activité neuronale.

Les cellules gliales de Müller en association avec l'EPR jouent un rôle notable dans l'homéostasie de l'hydratation de la rétine. Un drainage constant des liquides vers l'extérieur de la neurorétine est contrôlé par EPR qui déshydrate l'espace sous rétinien (102) et par les CGM qui déshydratent le tissu rétinien interne (104). Dans les rétines vascularisées, les CGM sont impliquées dans le contrôle de l'angiogénèse, la régulation du flux sanguin rétinien et contribuent à la formation et au maintien de la barrière hématorétinienne.

La couche plexiforme interne

Absente au niveau fovéolaire, cette couche est le siège de connexions synaptiques entre les cellules bipolaires, amacrines et ganglionnaires. Elle comporte 100000 contacts synaptiques par mm².

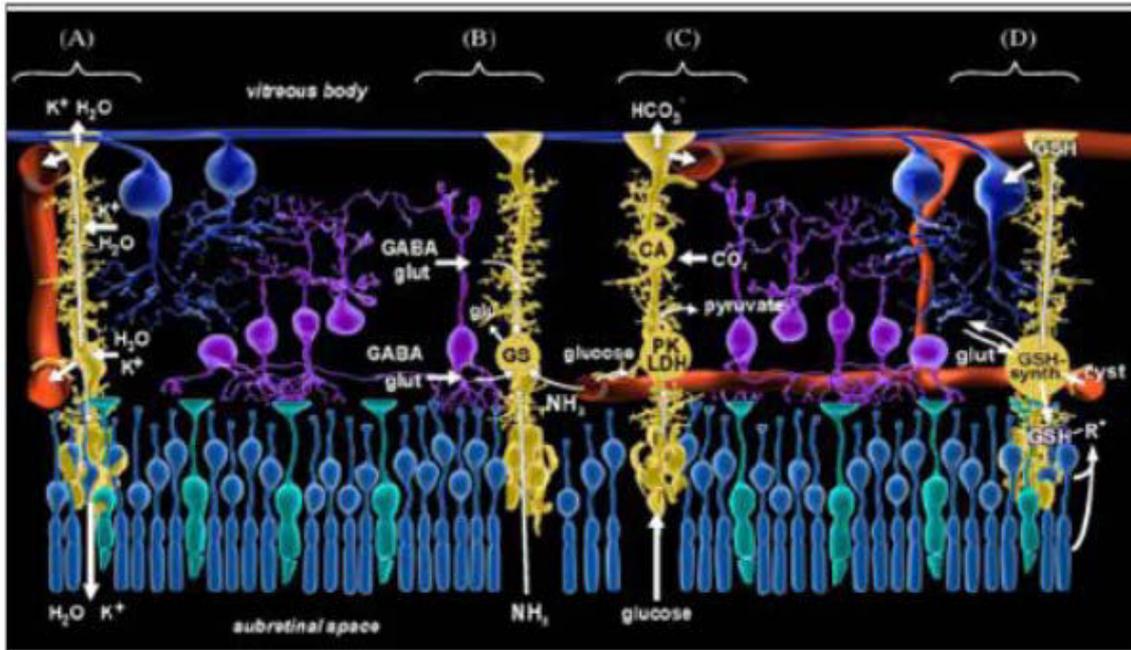


Figure 14: Interactions des cellules gliales de Müller avec les neurones et les vaisseaux rétiens dans une rétine mature (D'après Bringmann et al. 2006). (A) échange H₂O et K⁺. (B) recyclage des neurotransmetteurs. (C) symbiose métabolique. (D) métabolisme GSH, récupération des radicaux libre. CA: Carbonic anhydrase ; cyst : Cystéine ; GABA : gamma-aminobutyric acid ; glu : glutamate ; GS = glutamine synthétase ; GSH : glutathion ; LDH: Lactate déshydrogénase ; PK: pyruvate kinase ; R[°]: radicaux libres.

La couche des cellules ganglionnaires (CCG)

Formée des noyaux des cellules ganglionnaires, elle constitue la couche nucléaire la plus interne de la rétine. Les cellules ganglionnaires sont des neurones de grande taille (10 à 30 µm de diamètre), dotés d'axones très longs qui forment le nerf optique. Les signaux afférents des photorécepteurs parviennent aux cellules ganglionnaires par un réseau d'interneurones. Elles établissent des connexions avec les cellules bipolaires et amacrines grâce à leurs dendrites. Cette couche est très épaisse en périphérie de la rétine et disparaît au niveau de la fovéa.

La couche des fibres optiques (CFO)

Elle est constituée des axones des cellules ganglionnaires dont la taille varie de 0.6 à 2 µm. Comme pour la couche cellulaire précédente, son épaisseur atteint le maximum près de la papille pour ensuite régresser voir même disparaître au centre fovéolaire. Le lieu de convergence de ces axones pour former le nerf optique est appelé « Le disque optique ou la tache noire », une zone rétinienne totalement aveugle par l'absence des photorécepteurs.

La membrane limitante interne

Son existence a été longtemps contestée. Il s'agit d'une très fine membrane intercalée entre la rétine et le cortex vitréen, elle est continue sur toute la surface de la rétine et s'interrompt au niveau de la papille. Sa face externe est en contact avec les cellules gliales, surtout les cellules de Müller, qui dessinent sa forme en lui donnant un aspect irrégulier alors que son côté interne est constitué des adhérences vitréo-rétiniennes par des fibres de collagène.

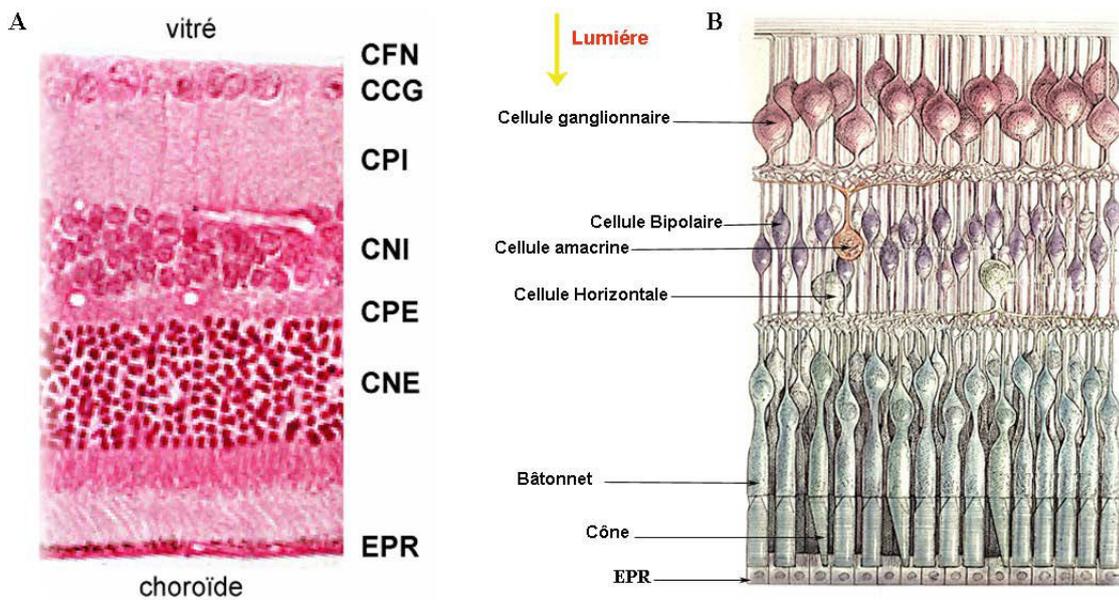


Figure 15: Architecture et morphologie des couches cellulaires de la rétine.

A) Coupe histologique laissant apparaître les différents rangés cellulaires de la rétine disposés en plusieurs étages et orientés par rapport au trajet lumineux : l'épithélium pigmentaire rétinien (**EPR**), la couche nucléaire externe (**CNE**) composée des corps cellulaires des photorécepteurs, la couche plexiforme externe (**CPE**), la couche nucléaire interne (**CNI**) : composée des noyaux de trois types de neurones, les cellules horizontales, bipolaires et amacrines, et des noyaux de cellules gliales de Müller (**CGM**). La couche plexiforme interne (**CPI**), la couche des cellules ganglionnaires (**CCG**) contient les noyaux des cellules ganglionnaires. La couche des fibres nerveuses (**CFN**) est la plus interne de la rétine (*D'après une communication de Francine Behar-Cohen*).

B) Schéma représentant la morphologie des principales cellules de la rétine impliquées dans la transduction du signal lumineux jusqu'au système nerveux central (*D'après Hubel 1988*).

2.2 La vascularisation du segment postérieur de l'œil

La rétine reçoit son apport sanguin par deux systèmes vasculaires distincts, sans aucune connexion anatomique dans les conditions physiologiques : *Le réseau sanguin rétinien* assurant la vascularisation des couches rétinienne internes et *la choroïde* qui alimente la rétine externe. L'œil est normalement dépourvu de vaisseaux lymphatiques, excepté dans la conjonctive (105).

2.2.1 La vascularisation de la rétine interne:

L'irrigation de rétine interne est assurée principalement par les branches de l'artère centrale de la rétine et accessoirement par les artères cilio-rétiniennes. De calibre oscillant entre 80 et 150 μ m de diamètre, l'artère centrale de la rétine naît des artères dérivant de la carotide interne. Il s'agit de l'artère ophtalmique dans 50% des cas, l'artère ciliaire longue médiale 38 % des cas et plus rarement d'une autre artère orbitaire : musculaire inférieure ou ciliaire longue latérale. Son trajet est simple, elle longe la face inférieure du nerf optique, en position médiane, 5 à 15 mm en arrière du globe oculaire puis elle se dirige vers l'avant elle se divise en quatre branches terminales : deux artères temporales, supérieure et inférieure, et deux artères nasales, supérieures et inférieures. Ces dernières vont à leur tour se diviser en artérioles et en capillaires formant le lit vasculaire rétinien. Localisées dans la CFO, les artérioles ont un calibre diminuant au fur et à mesure de leur division en périphérie où leur diamètre mesure 10 à 20 μ m. Elles sont formées d'une couche de cellules endothéliales reposant sur une membrane basale fine, une média musculaire formée de fibres musculaires lisses contenant des myofilaments et d'une adventice formée de tissu conjonctif. Quant aux capillaires, ils sont organisés en une ou deux rangées en périphérie, une superficielle dans la CCG et une profonde dans la CNI, et en trois ou quatre rangées dans la partie la plus centrale de la rétine. De 5 à 6 μ m de diamètre leur principale caractéristique est d'être des capillaires continus, non fenêtrés, ce qui les oppose à ceux de la choriocapillaire. Ils sont constitués de cellules endothéliales présentant des jonctions serrées (ZO: zonulae occludentes), ne présentant pas de pores, comprenant des vésicules de pinocytose qui révèlent leur activité métabolique. Elles sont entourées d'une épaisse membrane basale, de péricytes, de cellules microgliales et par les extensions des astrocytes (96).

Contrairement aux autres endothéliums vasculaires qui se renouvellent tous les deux ou trois ans, les cellules endothéliales rétinienne sont beaucoup plus stables et ne se renouvellent que après plusieurs années (25 ans) (106) L'ensemble de ce réseau vasculaire forme la barrière hématorétinienne interne.

Une zone de 850 μ m de diamètre, centrée sur la fovéa, ne possède pas de capillaires rétinien (zone avasculaire centrale (ZAC)) et dépend directement du réseau choroïdien sous-jacent, sa faible épaisseur rend possible cette situation (Figure 16).

Le drainage de la rétine est assuré par la veine centrale de la rétine (100 à 125 μ m de diamètre) qui se déverse dans la veine ophtalmique supérieure.

Le réseau vasculaire qui tapisse la rétine est facilement visualisable par imagerie non invasive et les méthodes modernes comme les préparations à plat et la microscopie électronique. Ceci a permis une meilleure connaissance de ces vaisseaux qui sont utilisés comme reflet de la microcirculation dans plusieurs domaines (107-108).

2.2.2 La vascularisation choroïdienne

La choroïde, située à proximité de l'EPR, est nécessaire pour apporter nutriments et oxygène au tiers externe de la rétine (Figure16), et en particulier aux cellules photoréceptrices, les plus consommatrices d'oxygène. En effet, 60 à 80% de l'oxygène rétinien provient de la choroïde (Nickla 2010). Son système vasculaire est formé par vasculogénèse, et non par angiogénèse. Il provient des branches de l'artère ophtalmique.

La choroïde comporte des cellules pigmentées (contenant des mélanocytes) et trois types de vaisseaux : **les capillaires (choriocapillaire)** de 15 à 30 μm de diamètre qui constituent un réseau capillaire très dense. Contrairement aux capillaires rétinien, ils sont formés d'une couche de cellules endothéliales comportant de larges fenestrations (60 à 90 nm) et sans jonctions serrées, **les vaisseaux moyens** comprenant les artérioles et les veinules et **les gros vaisseaux** formés d'artères (50 à 100 μm) et les veines choroïdiennes. Le sang est drainé par des veinules jusqu'aux quatre veines choroïdiennes qui convergent vers les veines vortiqueuses.

La choroïde, de 300 à 500 μm d'épaisseur chez l'homme, est limitée par la membrane de Bruch en avant et la membrane adhérente à la sclère en arrière. Entre la sclère et la choroïde un grand espace virtuel est identifié « l'espace suprachoroïdien » qui constitue l'une des voies d'administration des traitements dans le segment postérieur de l'œil.

Le débit sanguin choroïdien est le plus élevé de l'organisme, 2000 ml.min⁻¹ (Yu 1988, Kur 2012) (comparer au débit sanguin rénal qui est de 800 ml. min⁻¹ et le débit sanguin cérébral qui est d'environ 50 ml min⁻¹). Les vaisseaux choroïdiens ont également pour fonction d'éliminer le dioxyde de carbone et les déchets métaboliques produits au cours de la réaction photochimique vers la circulation périphérique. La choroïde semble être aussi impliquée dans la thermorégulation oculaire grâce à son débit sanguin très élevé qui pourrait dissiper la chaleur générée par l'activité des photorécepteurs (109).

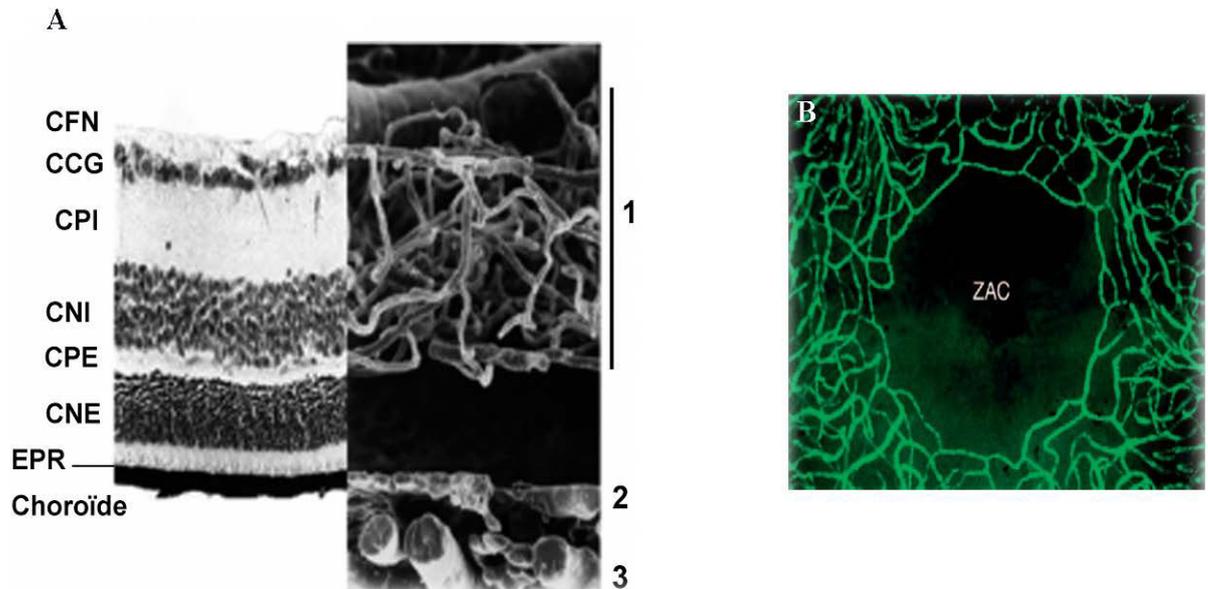


Figure 16: Vascularisation du segment postérieur (D'après Behar-Cohen et al. 2009).

A) A Droite, le moulage des systèmes d'irrigations rétinien met en évidence: 1, le réseau rétinien ; 2, les choriocapillaires ; 3, les artérioles et veinules, l'image de gauche montre une coupe histologique de rétine avec les couches rétinienne dépendantes de chaque réseau vasculaire. B) Montage à plat d'une rétine de singe et marquage de la vascularisation par une lectine couplée à la fluorescéine, mettant en évidence la zone avasculaire centrale (ZAC).

2.3 Les glucocorticoïdes en ophtalmologie

2.3.1 Le profil d'expression des récepteurs glucocorticoïdes dans l'œil.

L'œil a une production auto et paracrine de cortisol puisqu'il est produit par l'épithélium pigmenté de la rétine (110). Cette synthèse endogène additionnée à l'absence des protéines de transports (Cortisol Binding Globulin) expliqueraient les taux supra-plasmatiques du cortisol libre dans le vitré et l'humeur aqueuse (0,2µg/ml). Les glucocorticoïdes lient simultanément les RM et RG. La présence de ces récepteurs, notamment le RM, a été mise en évidence dans la rétine de bœuf, de rat et dans différents tissus de l'œil humain à plusieurs niveaux : les cônes, l'EPR, le corps ciliaire, l'iris, la cornée et le cristallin (111-112). Néanmoins, les outils utilisés pour ces études sont discutables (spécificité des anticorps RG et les technique utilisés) ce qui a rendu, jusqu'à peu, les résultats de l'existence des récepteurs glucocorticoïdes dans la rétine controversée et mal connue. Des travaux récents de notre équipe ont montré l'existence et la localisation des récepteurs RG et RM dans différentes couches cellulaires de la rétine du rat : cellules ganglionnaire, la couche nucléaire interne, en particulier au niveau des cellules gliales de Müller et l'EPR, comme dans les vaisseaux rétinien et la choroïde (Figure 17) (7).

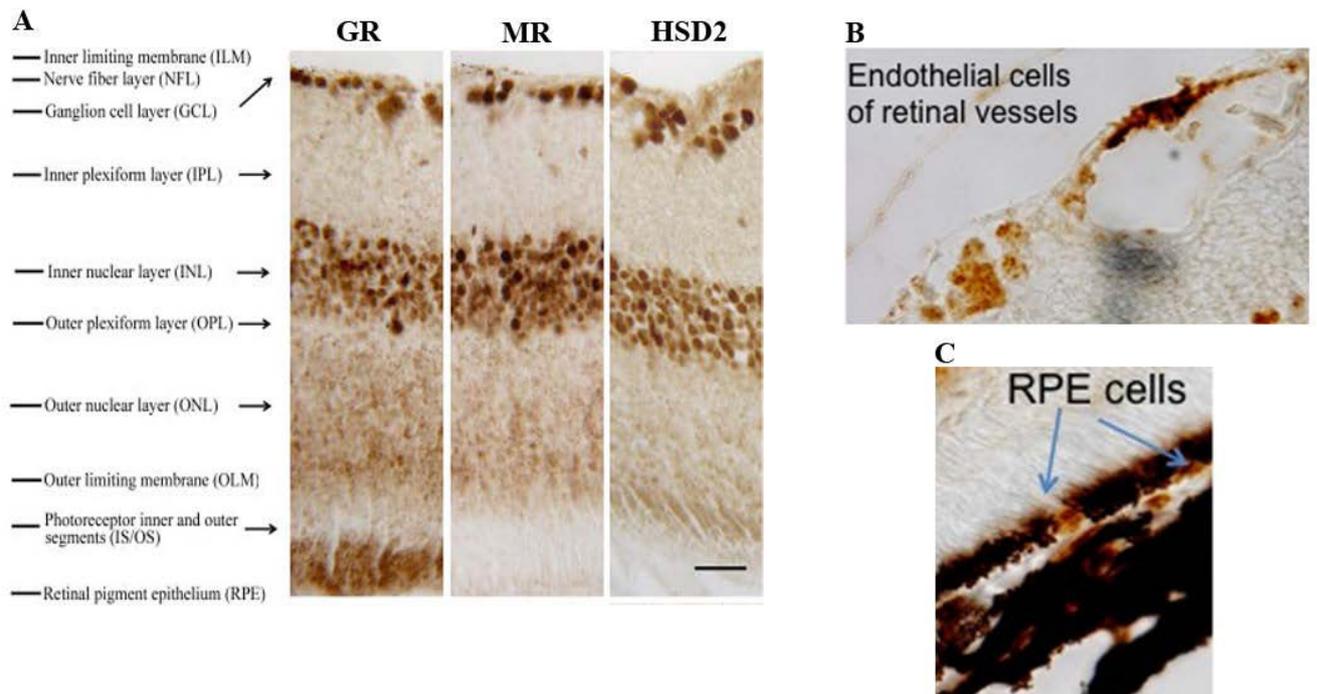


Figure 17: La répartition des récepteurs des glucocorticoïdes dans la rétine. A) Localisation cyto-histologique des récepteurs Glucocorticoïdes (GR), Minéralocorticoïdes (MR) et de l'hydroxystéroïde déshydrogénase 2 (HSD2) sur les coupes de rétine de rats (*D'après Zhao et al.2010*). Les Images B) et C) montrent respectivement l'expression des récepteurs Minéralocorticoïdes (MR) les vaisseaux rétiniens et les cellules de l'épithélium pigmenté de la rétine (EPR).

2.3.2 L'usage thérapeutique des glucocorticoïdes en ophtalmologie

En Ophtalmologie les glucocorticoïdes sont utilisés, par voie systémique ou locale (topique, sous-conjonctivale, intravitréenne), pour le traitement de nombreuses maladies inflammatoires d'étiologie diverses, notamment l'uvéïte et l'œdème maculaire (113-114).

L'accessibilité anatomique du segment antérieur de l'œil rend plus facile leur administration locale, sans avoir recours à des méthodes invasives associées à des risques d'infection et de traumatismes. Pour le traitement des maladies du segment postérieur la situation est plus complexe.

D'un côté, la disponibilité des principes actifs administrés par les voies locales (topiques, sous-conjonctivale, latéro-bulbaire, sous-ténonienne, supra-choroïdienne) est négligeable au niveau de la rétine et ne présente aucun intérêt thérapeutique (une partie du médicament est évacuée dans les voies lacrymales et vasculaires alors que l'autre est retenue par l'humeur aqueuse et le vitré) (115). De l'autre côté, la présence de la barrière hématorétinienne sélective s'oppose au passage des principes actifs administrés par voie générale, d'autant plus que pour atteindre

les concentrations thérapeutiques au niveau de la rétine, les doses administrées par voie systémique sont très élevées et causent beaucoup d'effets secondaires.

Les injections intravitréennes de Dexaméthasone (sous forme d'implant biodégradable, libérant progressivement 700 µg de principe actif) mais surtout la Triamcinolone Acétonide (TA) connaissent un succès grandissant depuis la fin des années 1990, due aux excellents résultats obtenus dans le traitement des maculopathies œdémateuses (Figure 17) et des uvéites non infectieuses (116).

La TA utilisée pour les injections intravitréennes se présente sous forme d'une ampoule de 40 mg/ml, le Kenacort retard P®, une préparation conçue pour les injections intramusculaires et intra articulaires et n'ayant pas d'AMM (autorisation de mise sur le marché) pour les injections intraoculaires. La TA étant injectée sous forme cristalline, l'augmentation de la dose administrée n'augmente pas la concentration intravitréenne de TA obtenue, mais augmente le temps nécessaire à la dissolution de la totalité des cristaux et donc augmente la durée d'efficacité du produit. En effet, la demi vie plasmatique de la TA est relativement longue 18 à 36 heures, comparée à celle de la Dexaméthasone 3-48 heures. Chez les patients non vitroectomisés la TA a été détectée 18,6 jours après administration intravitréenne (117). Parallèlement aux effets bénéfiques souhaités, il existe de nombreux effets délétères tels que l'augmentation de la pression intraoculaire, l'apparition de cataracte, une toxicité aigüe observée sur les cellules rétiniennes et les cellules endothéliales. Pour ces raisons le rapport bénéfice/risque des corticothérapies doit être soigneusement pesé surtout en traitement prolongé. Les mécanismes sous-jacents de l'action des glucocorticoïdes et leur toxicité cellulaire sont encore mal connus au niveau oculaire.

• 2.3.2.1 Les pathologies traitées avec les GCs

Comme nous l'avons déjà dit, de nombreuses pathologies oculaires sont traitées par les GCs. Celles que nous allons décrire représentent les principales causes de prescriptions de ces traitements en clinique.

Les maculopathies œdémateuses

L'œdème maculaire est le résultat de l'accumulation de fluide dans les couches rétiniennes autour de la fovéa (Figure 18). Cet œdème contribue à une diminution d'acuité visuelle centrale liée à l'altération des relations fonctionnelles cellulaires dans la rétine et entraîne une réaction inflammatoire secondaire. L'œdème maculaire n'est pas un signe spécifique d'une

affection oculaire mais une réponse à altération de l'environnement rétinien. Dans la plupart des cas, il est associé à une altération de la barrière hématorétinienne (BHR).

L'œdème maculaire peut survenir dans un grand nombre de situations telles que l'uvéite, le traumatisme, la chirurgie intraoculaire, les vasculopathies rétiniennes, les dystrophies héréditaires, le diabète et la dégénérescence maculaire liée à l'âge. L'œdème maculaire, peut être intracellulaire ou extracellulaire.

L'accumulation de fluide intracellulaire, aussi appelée l'œdème cytotoxique, est liée à une altération de la distribution ionique cellulaire. L'accumulation de fluide extracellulaire, qui est plus fréquente et plus importante en clinique, est directement associée à une altération de la BHR (118).

Les uvéites

L'uvéite est définie comme une inflammation de l'uvée, une structure oculaire qui comprend : l'iris, le corps ciliaire, et la choroïde. Cette inflammation peut également s'étendre aux tissus adjacents comme la rétine, le nerf optique, la sclère. Elle survient en réponse à une agression endogène ou exogène (une infection, un traumatisme et/ou une maladie auto-immune systémique ou oculaire). Les études épidémiologique ont rapporté que l'incidence mondiale annuelle de cette maladie est de 17-52 /100.000 et sa prévalence annuelle est d'environ de 38-714/100.000. Les facteurs génétiques, sociaux, géographiques et environnementaux peuvent influencer la distribution de l'uvéite au sein des populations (119).

Un tiers des formes d'uvéites sont dites « **idiopathiques** », (35%) des uvéites est d'**origine infectieuse**, et, près d'un quart (23%) des uvéites est d'**origine systémique**, principalement au cours de la sarcoïdose, de la maladie de Behçet, de maladies rhumatismales.

Le traitement comprend une corticothérapie locale associé à un mydriatique pour éviter la formation de synéchies (adhérence morbide de l'iris avec les tissus voisin). Les formes antérieures sévères et certaines formes postérieures nécessitent une corticothérapie par voie orale ou par injection directe dans l'œil.

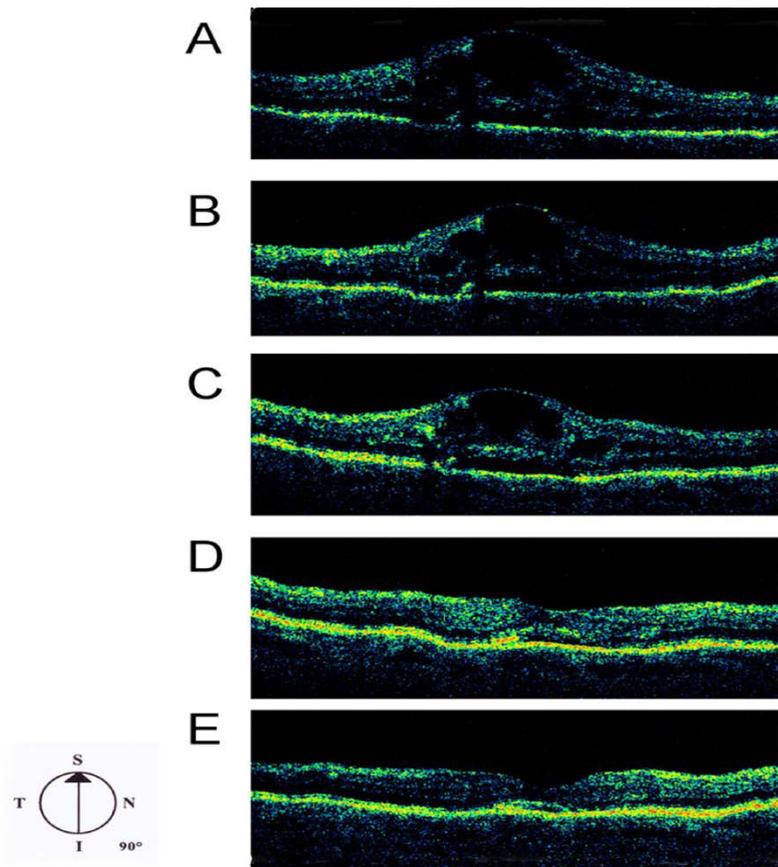


Figure 18: Les images de la tomographie à cohérence optique d'une patiente de 85 ans présentant un œdème maculaire consécutif à une obstruction de la veine centrale de la rétine. A) L'état de la rétine avant l'injection intravitréenne de la Triamcinolone Acétonide B) 1 Heure après l'injection, C) 2 Heures après l'injection, D) 1 semaine après l'injection, E) 2 semaines après l'injection de TA avec résorption totale de l'œdème et réarrangement des structures histologiques de la rétine (*D'après Noriko Miyamoto et al.2006*).

2.3.3 La toxicité des Glucocorticoïdes sur les vaisseaux

Les impacts des glucocorticoïdes sur les vaisseaux sanguins sont connus depuis longtemps. En 1962, McKenzie et Stoughton ont révélé, par des tests sur la peau humaine, le pouvoir vasoconstricteur des glucocorticoïdes quantifié par le blanchiment de la peau des zones traitées. Plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes de toxicité induits par les glucocorticoïdes, à des doses et durées différentes, sur les vaisseaux et l'unité cellulaires qui les constituent.

In vitro, des études ont montré que la triamcinolone Acétonide (TA) affecte fortement la viabilité des cellules endothéliales de la rétine bovine. En effet, une perte de la moitié de la population cellulaire initiale a été constatée après à 24 h de traitement avec 1mg/ml de TA. Un résultat alarmant car cette concentration de principe actif est injectée dans le vitré chez l'Homme en clinique ophtalmologique. La perte de viabilité cellulaire était proportionnelle à

la dose et la durée d'exposition (120). Les glucocorticoïdes créent également un stress oxydatif et une cytotoxicité sur les cellules endothéliales qui se traduit par l'activation des voies de mort cellulaires indépendantes des caspases (121). D'autres études ont montré que les glucocorticoïdes affectaient les protéines de la matrice extracellulaire des cellules endothéliales de la choroïde bovine (TA) (122) et les molécules de jonctions des cellules endothéliales telles que les Claudine-5 et occludine (123). En 2002, Chen et son équipe ont montré que la Dexaméthasone provoquait une diminution de l'expression des molécules d'adhésions (ICAM-1, E-selectin, VCAM-1), importante pour les connexions des cellules entre elles et avec la matrice extracellulaire dans les cellules endothéliales de la microvascularisation dermique et ombilicale (70). Les glucocorticoïdes modifient la distribution du réseau de la F-actine dans la cellule endothéliale, contre la synthèse du VEGF et s'oppose à la formation des tubes des réseaux vasculaires (80).

In vivo, Nombreux sont les travaux de recherche qui ont montré le rôle antiangiogénique de la TA et son pouvoir d'inhiber la formation de néovaisseaux dans la rétine (124-125). Ainsi, dans un modèle de neovascularisation provoqué chez des souris C57/B6 par impacte laser, la TA réduit la formation de néovaisseaux et stimule dans les cellules endothéliales de ces derniers, la voie de la LEI/LDNase II, une voie de mort cellulaire indépendante des caspases (120). En 2009, des travaux de notre équipe ont montré que la TA injectée chez le rat provoquait une réduction du réseau choroïdien, le rétrécissement du diamètre et de la densité des microvaisseaux rétinien (121). Par contre, d'autres études ont suggéré que cette toxicité ne doit pas être directement attribuée à la TA. En effet il a été dit que l'excipient présent dans la formulation, alcool benzylique, pouvait être toxique. De même ; les cristaux formés par la TA ne seraient pas dépourvus d'effets délétères sur les tissus rétinien et seraient à l'origine d'une cytotoxicité par un stress mécanique par contact direct avec les cellules (126). De la même manière que les expériences *in vitro*, les glucocorticoïdes portent atteinte à la membrane basale des réseaux vasculaires et augmentent leur perméabilité (127), ils provoquent aussi, avec une cinétique doses et temps dépendantes, la mort des pericytes de la microvascularisation cérébrale (128).

Chez les lapins les glucocorticoïdes comme la prednisone causent une occlusion vasculaire à l'origine de la nécrose de la tête du fémur (129), une complication souvent redoutée chez les patients sous corticothérapie élevée et chronique.

L'ensemble de ces études confirme que les effets toxiques des glucocorticoïdes sur les cellules endothéliales et les vaisseaux sont irréfutables, surtout qu'elles ont été réalisées avec

des molécules de structure et de propriétés chimiques différentes, sur des espèces et des modèles expérimentaux variés et employés un panel de doses et des cinétiques de traitement distinctes. Malgré tout, les connaissances sur les mécanismes et les voies de signalisations qui traduisent cette toxicité restent à ce jour peu élucidés.

3 La mort cellulaire

La mort est la règle d'or de la vie, un oxymore dont la profondeur philosophique révèle une noblesse génétiquement ancrée, car rien de plus généreux que de programmer son suicide par abnégation à la survie des autres !

C'est en 1964 que l'expression « Mort cellulaire programmée » est apparue pour décrire un état de suicide d'un groupe de cellules (130). Plus tard les chercheurs ont montré qu'effectivement, cette mort cellulaire programmée profite à l'organisme de toutes les espèces eucaryotes multicellulaires allant du nématode jusqu'à l'homo-sapiens. Chez l'Homme elle intervient au cours de la morphogénèse embryonnaire (La formation du tube neural, des organes, la séparation des doigts, la vésicule optique), la mise en place du système immunitaire, la différenciation sexuelle (la testostérone induit la mort des cellules mammaires chez les mâles), le contrôle du nombre des cellules pendant le développement, ainsi que l'élimination des cellules endommagées ou dysfonctionnelles ce qui est primordial pour l'homéostasie des tissus. Mais la mort cellulaire est une arme à double tranchant étant donné que son dérèglement est à l'origine de plusieurs pathologies comme, le cancer où elle est inhibée, les maladies auto-immunes, les maladies neurodégénératives où elle est suractivée et les maladies infectieuses telles que l'hépatite et le SIDA.

La mort cellulaire est un phénomène complexe faisant intervenir un grand nombre de processus à la fois biochimiques et morphologiques résultant d'une réponse à des stimuli de stress endogène et/ou exogène. Ils existent plusieurs types de mort cellulaire et l'activation de l'une ou l'autre dépend du type de stress, des interactions entre les facteurs inducteurs de la mort cellulaire, du statut de la cellule (Exemple : sa stabilité génomique, l'environnement péri-cellulaire), son contenu en organites et la composition de son arsenal protéique et enzymatique. Bien souvent il n'y a pas activation d'une seule voie de mort, mais plusieurs cascades de signalisation peuvent intervenir simultanément ou de manière différée dans la même population cellulaire pour aboutir à leur mort (131-133).

3.1 Aperçu historique sur la mort cellulaire

Dans la quête de l'accroissement de la longévité et de l'immortalité, les recherches sur la mort cellulaire, délaissées dans les siècles précédents, sont en plein essor dans de nombreux domaines scientifiques, dans la perspective de mieux comprendre son mécanisme pour bien maîtriser ce phénomène physiopathologique notamment en cancérologie.

La forme la plus étudiée de mort cellulaire est l'apoptose. Le mot apoptose provient d'une locution grecque signifiant "chute des feuilles" utilisée par Hippocrate de Kos (460-377 av. J.C.) pour décrire la "chute des os" post-mortem. Galien (201-131 av. J.C.), le père de la pharmacie, avait déjà décrit une régression post-natale du canal artériel (*ductus arteriosus*) mais sans tirer des conclusions ou émettre des hypothèses sur une éventuelle mort cellulaire. En 1842, Karl Vogt a parlé pour la première fois de l'auto-initiation de la mort cellulaire physiologique, au cours de la métamorphose des amphibiens (chez le crapaud) (134). Par la suite, la fin du XIX^{ème} et le début du XX^{ème} siècle ont été marqués par une multitude d'expériences pour comprendre le processus de mort cellulaire. En 1885, Walter Flemming décrit la fragmentation et la disparition progressive des noyaux et des cytoplasmes de cellules épithéliales des follicules ovariens en régression (135). Ensuite, Weismann en 1864 et d'autres chercheurs de son époque ont décrit les aspects morphologiques de la mort cellulaire.

En 1951, Alfred Glucksmann émet l'hypothèse selon laquelle cette "mort cellulaire" se produirait à des moments bien précis du développement d'un organisme (136). Cette hypothèse sera confirmée quelques années plus tard par Richard Lockshin (1964) qui a appelé « Mort cellulaire programmée » une séquence d'événements contrôlés, conduisant à la mort de la cellule à un moment déterminé au cours du développement. En 1972 John Kerr, Andrew Wyllie et Alastair Curie introduisent le mot "apoptose" pour désigner une forme de mort cellulaire caractérisée par un processus actif, organisé temporellement, au cours duquel la cellule affiche des modifications morphologiques et structurales aboutissant à sa destruction complète (137), en opposition au modèle de la nécrose déjà connu à l'époque. Enfin, c'est au cours des 30 dernières années, et grâce notamment aux recherches menées par John Sulston, Sydney Brenner et Robert Horvitz sur le développement du nématode « *Caenorhabditis elegans* », que le programme génétique et moléculaire associé au déclenchement et à la transduction du signal apoptotique a été déchiffré. John Sulston, Sydney Brenner et Robert Horvitz ont reçu le prix Nobel de Médecine et Physiologie en 2002.

3.2 La classification morpho-biochimique de la mort cellulaire

Récemment, le Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD) a proposé un catalogue de classifications des différents types de mort cellulaire dans lequel les modalités de descriptions de la mort des cellules sont à nouveau réévaluées, afin de mettre à disposition de la

communauté scientifique des appellations universelles, non rigides, qui regroupent les caractéristiques morphologiques et biochimiques de toutes les morts cellulaires décrites.

Les classifications précédentes se basaient exclusivement sur les critères morphologiques, néanmoins, les moyens technologiques sophistiqués dont nous disposons actuellement ont permis de mettre en évidence la biochimie des effecteurs des cascades de signalisation intracellulaires qui régulent et exécutent la mort cellulaire (138-139).

Dans les parties suivantes nous nous focaliserons sur les voies de mort étudiées dans cette thèse : la nécrose, l'autophagie, la mort cellulaire dépendante des caspases (Caspase-3) et la mort cellulaire indépendante des caspases (AIF et LEI/L-DNase II). Les autres catégories de mort cellulaire de la nouvelle classification seront décrites de façon succincte.

3.2.1 Autophagie

Le mot autophagie provient des mots grecs « *auto* » : soi-même et « *phagos* » : manger. Elle traduit un phénomène d'autodigestion caractérisé par la formation de vésicules à double membrane qui contiennent une partie du cytoplasme ou des organites cellulaires, qui sont catabolisés après fusion des vésicules avec les lysosomes. Depuis longtemps l'autophagie a été différenciée de l'apoptose du point de vue morphologique (présence de vacuoles autophagiques), temporel (l'autophagie est un processus plus long que l'apoptose) et biochimique (caractérisation des acteurs effecteurs dans chaque type de mort cellulaire).

L'autophagie est un processus complexe à double visage : tout d'abord, elle intervient dans des processus physiologiques tels que le développement, la différenciation cellulaire, le contrôle de la croissance, la défense de la cellule et le remodelage des différents tissus. Au niveau basale d'activation, elle participe au renouvellement des protéines à durée de vie longue et de certains organites comme la mitochondrie, au nettoyage de la cellule quand il y a une accumulation de protéines agrégées et à l'approvisionnement des cellules en nutriments par la digestion et le recyclage des composants cellulaires. Elle est à la base un mécanisme de survie cellulaire.

L'engagement de l'autophagie dans la voie de la mort cellulaire résulte de la pléthore des signaux de stress comme: la surcharge en protéines mal constituées ou la privation de nutriments - notamment des acides aminés – ou des facteurs de croissances face auxquels le pouvoir antistress de l'autophagie est exacerbé puis dépassé et enfin transformé en un mécanisme de mort cellulaire (Figure 19). La découverte récente des bases moléculaires de l'autophagie a montré aussi son implication dans de nombreuses pathologies comme la

progression tumorale (140) dans la mort neuronale associée à de nombreuses maladies neurodégénératives (maladies de Parkinson, d'Alzheimer et de Huntington) (141), et dans certaines formes de myopathies (142).

Seule l'implication de l'autophagie dans la mort cellulaire sera abordée dans les paragraphes suivants (143).

Depuis peu, l'utilisation du concept d'autophagie comme mécanisme effecteur la mort cellulaire est très discutée. La question est : est-ce que l'autophagie **accompagne** la mort cellulaire à côté d'autres mécanismes ou est-ce qu'elle **exécute** la mort des cellules ? Les deux suggestions sont appuyées par des études qui les soutiennent.

Effectivement, les cellules qui ont déclenché le processus de mort cellulaire (surtout l'apoptose) activent aussi l'autophagie comme une réponse protectrice pour essayer de surmonter le stress auquel elles sont soumises. L'inhibition de l'autophagie dans ce contexte accélère la mort de la cellule, comme le montre l'étude de Boya et al en 2005 (144). Cette association entre l'apoptose et l'autophagie est observée dans la plupart des cas. Mais dans certaines conditions, la cellule peut mourir par autophagie comme montré dans les études sur les cellules MCF-7 (cellules de carcinome mammaire) traitées à la Fenretinide ou la Camptothecine. Dans ces cellules la caspase 3 n'est pas fonctionnelle et donc les traitements induisent la mort de ces cellules par la voie autophagique (145). Plus récemment, des auteurs ont montré que lors du traitement des cellules ARPE-19 avec l'HMA, les cellules activent l'autophagie comme mécanisme de protection mais que cette même réponse fini par provoquer, lorsque le traitement se prolonge, la mort des cellules(146).

De nos jours, plusieurs types d'autophagie ont été recensées dont la macroautophagie communément appelée « Autophagie », la microautophagie, la macroautophagie alternative, l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes(AMC). Plus récemment « la mitophagy » a été attribuée à l'autophagie sélective impliquée dans le renouvellement des mitochondries et la « peroxyphagie » à celle visant spécifiquement les peroxyosomes (147-148).

Néanmoins, c'est essentiellement la macroautophagie qui intervient dans la mort cellulaire et qui sera abordée par la suite (143).

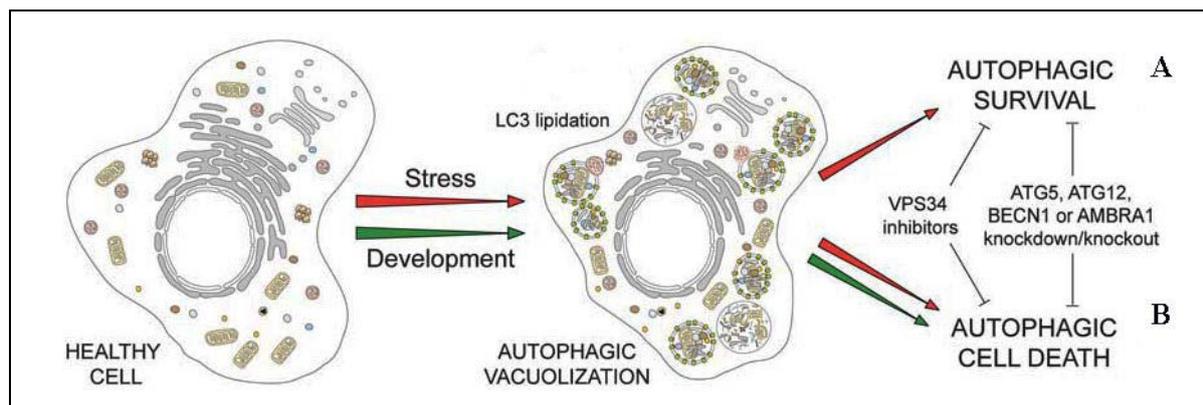


Figure 19 : Schéma d'une cellule autophagique séquestrant les différents constituants de la cellule dans les conditions physiopathologiques. A) le stress surabondant induit une autophagie après avoir épuisé les fonctions cytoprotectrices de la cellule. L'imbibition de l'autophagie dans ce cas accélère la mort cellulaire. B) L'intervention de l'autophagie dans le maintien de la survie cellulaire; si l'autophagie est inhibée par un agent chimique ou un remaniement génétique la cellule s'engage vers une mort par autophagie.

3.2.1.1 La macroautophagie généralement appelée autophagie tout court est généralement considérée comme un mécanisme de séquestration non sélectif du matériel cytoplasmique dans des vacuoles autophagosomales. Les découvertes sur les molécules qui contrôlent l'autophagie au cours de ces dernières années ont révolutionné la précision de détection et la manipulation génétique de ce processus. Osumi a été l'un des pionniers dans la caractérisation des gènes qui participent à l'exécution de l'autophagie. Ces gènes sont appelés ATG (autophagy-related genes). A l'issue de nombreux travaux, il a conclu que sur le plan morphologique, génétique et mécanistique, les différents orthologues des gènes l'autophagie étaient conservés depuis la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) jusqu'au mammifère. Les protéines issues de ces gènes forment des complexes qui régulent les différentes étapes de l'autophagie dont la nucléation, l'élongation de la membrane de l'autophagosome, la fermeture de l'autophagosome, la fusion de l'autophagosome avec le lysosome et la dégradation du contenu de l'autophagolysosome (149-150).

La nucléation se fait à partir du recrutement des lipides des membranes du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi et de la membrane plasmique, mais aussi du recrutement des protéines qui vont s'associer en complexes pour former l'autophagosome, comme *vacuolar sorting protein 34* (VSP34), ATG6/Beclin1 et VSP15, puis le transit continue jusqu'à ATG9 pour former ainsi la membrane d'isolation. Ensuite cette membrane est élonguée grâce à l'action de ATG7 qui s'associe au complexe formé par l'hétérodimère ATG 5/12 et l'homodimère formé de deux ATG6/Beclin1. L'élongation n'est complétée qu'après la lipodation de la protéine ligth chaine 3 (LC3I) en isoforme LC3II qui va se conjuguer avec les complexes préalablement assemblés au niveau de la membrane de

l'autophagosome. Le LCII est le marqueur spécifique le plus employé pour désigner la formation de la vésicule autophagique (140). Finalement, la double membrane se ferme et fusionne avec les lysosomes (Figure 20). Les hydrolases du lysosome ainsi que l'acidification de la lumière de l'autophagolysosome, grâce à la pompe à proton lysosomale, provoquent la dégradation de son contenu pour qu'il soit recyclé en composants simples et libéré dans le cytoplasme.

Le mécanisme de régulation de l'autophagie le mieux caractérisé est celui dépendant de la protéine kinase mammalian target of rapamycin (mTOR). mTOR est très conservée chez les vertébrés, elle régit plusieurs mécanismes cellulaires entre autres, la transcription et la synthèse protéique. Elle régule négativement l'autophagie. Quand les nutriments sont suffisants mTOR est activée et l'autophagie inhibée. Cependant l'absence de nutriments n'est pas la seule cause d'autophagie. L'accumulation des protéines mal conformées, les organites endommagés, des agents infectieux, peuvent déclencher l'autophagie par des mécanismes indépendants de mTOR (149, 151). Un autre régulateur négatif de l'autophagie est la protéine death-associated protein 1 (DAP1). Si mTOR est inhibé, DAP1 est déphosphorylée ce qui aide à prévenir une activation non contrôlée de l'autophagie. Il est évident qu'on peut également inhiber l'autophagie par des agents chimiques (comme les inhibiteurs de la VSP34) ou des modifications génétiques (Mutation, Knockout, SiRNA) de la machinerie moléculaire essentielle à l'activité autophagique (ATG5, ATG12, Beclin1) (138).

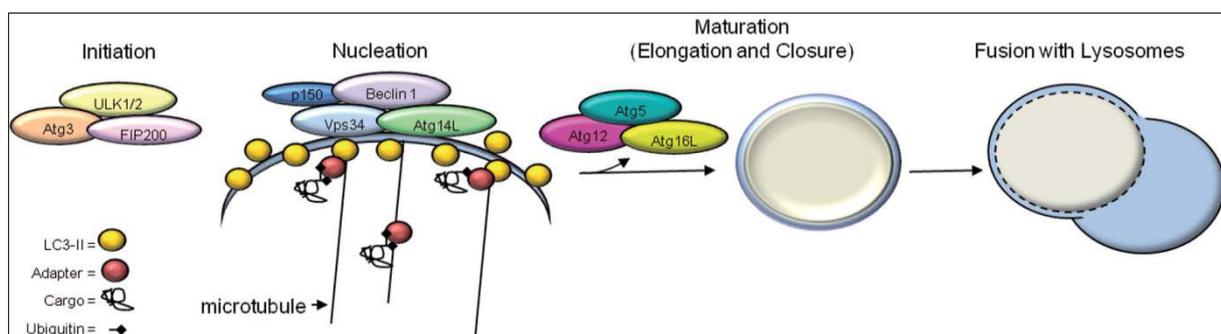


Figure 20 : Illustration simplifiée des différentes étapes de la macroautophagie. (D'après D.M. Benbrook et al, 2012).

3.2.2 Nécrose

Le terme « nécrose » a pour origine le mot grec « *Nekros* » qui signifie « mort » ou « cadavre ». Longtemps, elle a été considérée comme le résultat d'un stress physico-chimique aboutissant à un phénomène de destruction cellulaire accidentel et incontrôlé.

La nécrose est définie par l'absence des traits morphologiques et fonctionnels de l'apoptose et de l'autophagie. En effet elle se caractérise par un gonflement généralisé de la cellule et des organites, surtout les mitochondries et le réticulum et une dégradation aléatoire de l'ADN génomique. Rapidement l'intégrité de la membrane cytoplasmique est rompue et le contenu cellulaire est libéré dans le milieu extracellulaire. Ceci est suivi par une réaction inflammatoire, caractérisée par l'afflux des cellules immunitaires notamment les polynucléaires neutrophiles et les lymphocytes. Les conséquences du pouvoir immunogène de la nécrose n'est pas négligeable sur les tissus adjacents et restent proportionnelles à l'étendue de la zone touchée et à l'intensité de la réaction inflammatoire.

Récemment, les travaux de nombreuses équipes ont rendu claire l'idée que la nécrose s'opère, elle aussi, de manière contrôlée, via une machinerie moléculaire, dans certaines situations de cytotoxicité. Les inducteurs de la nécrose sont nombreux. On peut citer à titre d'exemple les agents alkylants de l'ADN, les cytotoxines, les agonistes des récepteurs de mort membranaires. Il a été également montré qu'il existait un lien entre l'activité des caspases notamment la caspase 8 et l'induction de la mort par nécrose. En effet, il semblerait que la caspase 8 régule négativement la protéine kinase de RIP1 (Receptor interacting protein 1) ce qui empêche le recrutement du RIP3 (homologue du RIP1) et la formation du couple RIP1/RIP3, principal régulateur de la nécrose programmée. En outre, il a été montré que l'inhibition de la RIP1 par la nécrostatine 1 empêche la dégradation nécrotique des cellules. L'ensemble de ces données renforce l'idée de la mort cellulaire par nécrose programmée ou « nécroptosis » (152-153).

Actuellement, l'emploi du terme « nécroptosis » pour désigner le processus de la nécrose est très discuté, dans le sens où cette nouvelle appellation est appropriée dans certaines circonstances où la nécrose est contrôlée par la cellule, mais en aucun cas pour représenter le phénomène de la nécrose de façon générale dans toutes les situations(138).

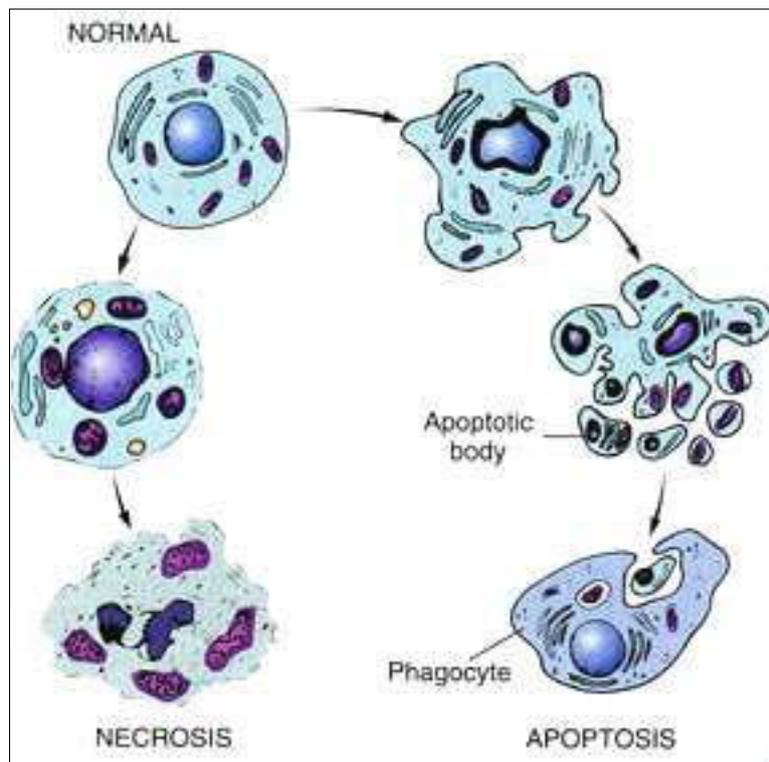


Figure 21 : Schéma comparatif des caractéristiques morphologiques de la nécrose versus apoptose. (2002OuluUniversityLibrary<http://herkules oulu.fi/isbn9514266676/html/i267388.html>)

3.2.3 L'apoptose

L'apoptose ou la mort cellulaire programmée a été décrite tout au début sur la base des caractéristiques morphologiques des cellules. L'apoptose se déroule en trois phases. Les deux premières, dites d'initiation et de décision sont toutes les deux réversibles et modulables par des facteurs anti-apoptotiques. La troisième phase, dite d'exécution ou de dégradation est irréversible. Au long de ces trois phases l'architecture de la cellule est modifiée suite à la condensation du cytoplasme, la formation de protubérances au niveau de la membrane, la condensation de la chromatine nucléaire, la fragmentation inter-nucléosomique de l'ADN, et enfin la scission de la cellule en corps apoptotiques qui sont éliminés par les macrophages et les cellules avoisinantes. Cette prise en charge rapide des corps apoptotiques évite la libération de leur contenu dans le milieu environnant et l'activation d'une réaction inflammatoire. Plusieurs signaux extra ou intracellulaires, physiologiques comme pathologiques peuvent stimuler la mort par apoptose, entre autres les dommages de l'ADN, le stress oxydatif générant les radicaux libres (154), la surcharge en Ca^{+2} cytosolique, les traitements par des molécules cytotoxiques ou des glucocorticoïdes, un manque en facteurs de croissance, etc. Néanmoins, en dépit de la diversité des facteurs déclenchant, ils transitent tous généralement par une première phase commune à tous les types de cellule, conservée à travers

l'évolution, et initiée par l'activation de protéases. Plusieurs protéases sont impliquées dans la mort cellulaire, qu'elle soit dépendante des caspases ou non. Elles jouent un rôle clé dans le processus apoptotique. Néanmoins, celles impliquées dans la voie dépendante caspase sont les mieux étudiées.

- **3.2.3.1 Les principaux acteurs de l'apoptose.**

Les caspases

Les caspases sont des protéases de la famille de l'*interleukin-1 converting enzyme* dont le site actif contient une cystéine et clive leur substrat à la suite d'un résidu aspartique, ce qui a été d'ailleurs à l'origine de leur dénomination par Alnemri en 1996 donc "caspase" pour "*Cysteinyl aspartate specific protease*»(155). Elles possèdent un pentapeptide très conservé dans leur site actif «QACXG». Toutes les caspases sont synthétisées sous forme de zymogènes (Pro-enzymes) qui s'activent en cascade en réponse à des stimuli. Elles sont constituées un pro-domaine très conservé dans la partie N-terminale et d'un domaine C-terminal. Ce dernier est constitué d'une grande sous-unité (20kDa) qui contient le site catalytique et d'une petite sous-unité (10kDa).

L'activation des caspases impose un double clivage, le premier vise à dissocier les deux sous unités du domaine C-terminal par une coupure au niveau de la sous-unité (10kDa) et le seconde à dissocier les deux domaines N-terminal et C-terminal libérant ainsi un fragment catalytique qui se dimérise pour former la caspase active (Figure 22) (156-157).

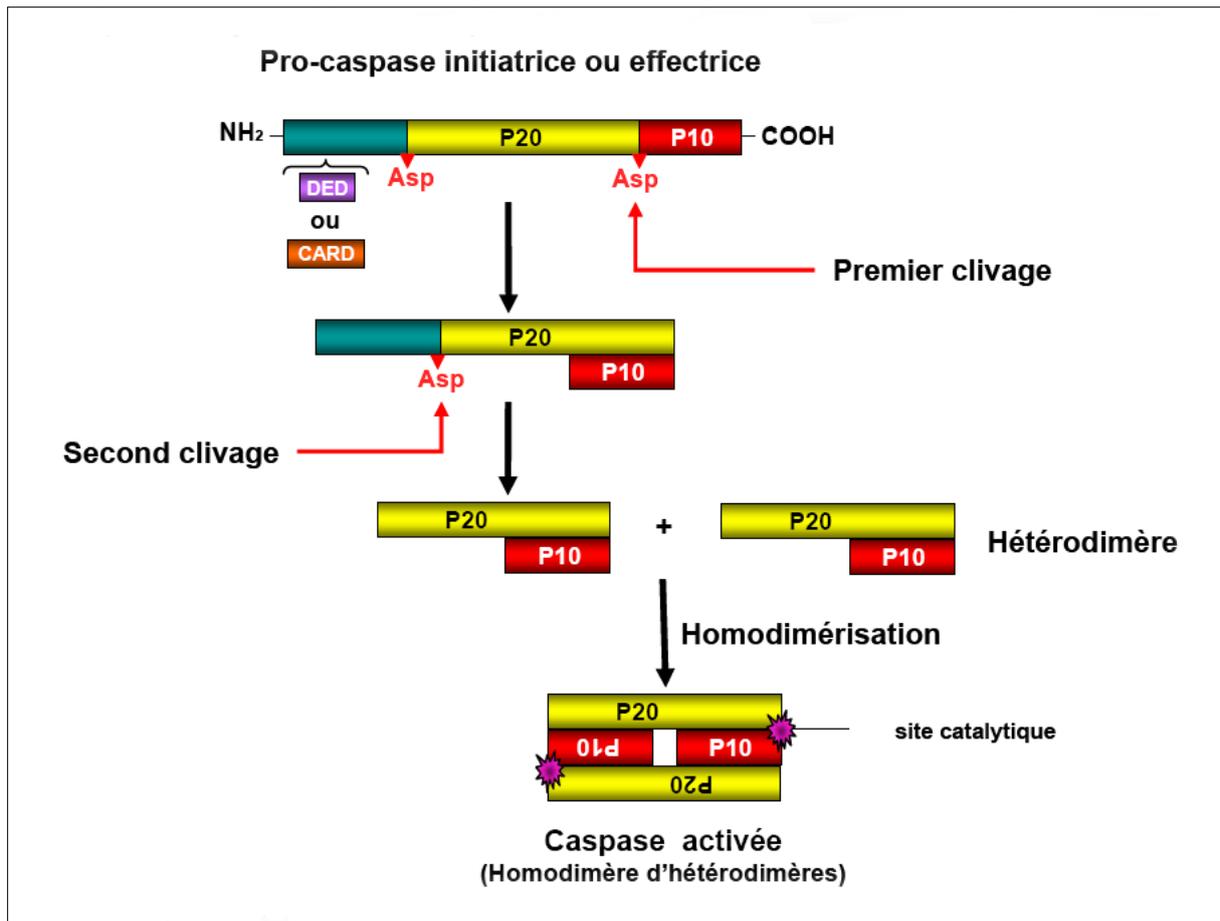


Figure 22: Schéma du mécanisme général d'activation des caspases.

Les structures des pro-caspases initiatrices et effectrices sont représentées par l'association des pro-domaines N-terminaux en bleu, les grandes sous-unités en jaune et les petites sous-unités en rouge. La caspase active résulte de la protéolyse, de l'assemblage de deux précurseurs et l'exposition des sites catalytiques (*D'après Amarante-Mendes et Green, 1999*).

A ce jour quatorze caspases ont été identifiées chez les mammifères dont douze ont été clonées chez l'Homme. Une vingtaine de substrats des caspases ont été caractérisés. Les cibles de la caspases appartiennent à toutes les fonctions cellulaires : les effecteurs du cycle cellulaire (p21, p27), le cytosquelette (Actine, flamine), le système immunitaire (pro-IL1 β), les régulateurs de la mort cellulaire (La familles des Bcl-2), le complexe formé de la Caspase-Activated DNase (CAD) avec son inhibiteur), les systèmes de réparation de l'ADN (PARP-1: poly ADP-ribose polymérase).

L'action des caspases sur ces effecteurs se traduit dans la majeure partie des cas par l'inhibition de leur activité de base, comme pour PARP-1 (Plus de détails plus loin).

Les caspases impliquées dans la mort cellulaire se répartissent en deux groupes : le premier intervient au début de la cascade de signalisation et comprend les caspases initiatrices : la caspase 2, la caspase 8, la caspase 9 et la caspase 10 et le second représente les caspases exécutrices activées pendant la phase terminale du processus apoptotique, il s'agit des

caspases 3, 6 et 7. La caspase 3 activée est un marqueur souvent ciblé par les chercheurs pour identifier l'apoptose dépendante des caspases.

Il existe un autre groupe de caspases formé des caspases 1, 4, 5, 11, 12 et 13 qui sont responsable du clivage et de la maturation des protéines pro-inflammatoires tels IL1 β et IL18, ce sont les caspases dites « inflammatoires ».

Les pro-caspases initiatrices possèdent un pro-domaine N-terminal long contenant de 130 à 200 résidus. Les segments N-terminaux des caspases 8 et 10 contiennent des domaines effecteurs de mort (DED; *Death effector domain*), alors que les caspases 2, 4 et 9 possèdent un domaine de recrutement des caspases (CARD; *Caspase recruitment domain*). Ces différents domaines (DED et CARD) sont primordiaux pour l'activation des caspases par des interactions protéines-protéines (158-159).

Les pro-caspase initiatrices ont une activité protéasique résiduelle et sont capables de s'auto-activer. En effet, sous le contrôle de complexes protéiques localisés dans la membrane cellulaire ou dans le cytoplasme, elles s'associent à des protéines connues sous le nom de protéines adaptatrices, elles se rassemblent, s'oligomèrisent et se lient aux senseurs apoptotiques, tels que les récepteurs de mort ou l'apoptosome mitochondriale. Ce dernier est constitué de cytochrome c (cyto c), de la protéine Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1), d'ATP et une fois formé, il va recruter la pro-caspase 9 (Figure 23) ; il en résulte une concentration locale élevée en pro-enzymes permettant la protéolyse inter- et intra-moléculaire (Figure 24). Les caspases effectrices sont incapables de s'auto-activer, leur maturation et activation dépendent des caspases initiatrices.

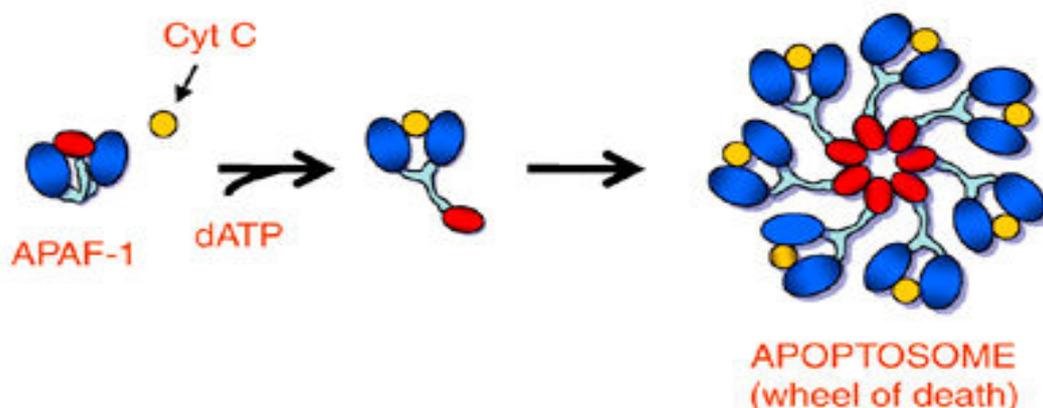


Figure 23: L'assemblage de l'apoptosome. Suite à la fixation du Cyt c sur le domaine d'Apaf1 en présence d'une molécule de dATP, un changement de conformation permet la formation de l'apoptosome et le recrutement de la caspase 9. L'apoptosome est formé de 7 unités Apaf-1-cyt c. (D'après Fadeel.B et al .2008)

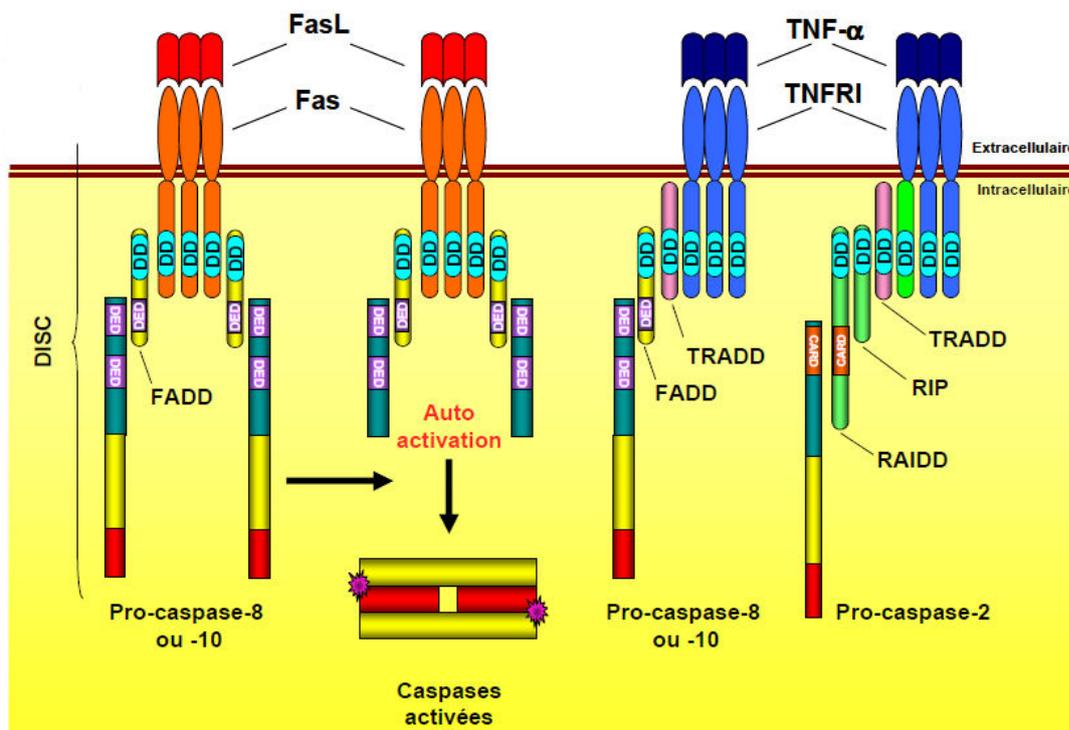


Figure 24 : Recrutement et auto-activation des caspases initiatrices par les récepteurs membranaires. L'auto-activation des caspases initiatrices nécessite leur rapprochement. Ceci peut se faire par interaction avec des récepteurs membranaires. En fonction du type de pro-caspase et/ou du récepteur concerné, plusieurs molécules adaptatrices sont recrutées (d'après Lavrik *et al.* 2005).

Les caspases effectrices : Comme préalablement mentionné, Près de 100 substrats de caspases ont été rapportés indiquant la complexité du phénomène de mort par apoptose. L'un des mécanismes les plus étudiés est l'activation des nucléases conduisant à la fragmentation de l'ADN. Chez l'homme, elles portent le nom de DFF pour facteur de fragmentation de l'ADN alors que chez la souris elles sont appelées CAD pour «Caspase Activated-DNase» (elles sont retrouvées souvent sous le nom de CAD dans le Medline). A l'état quiescent, Elles baignent dans le cytoplasme de la cellule sous forme de complexe inactif parce qu'elles sont liées à une sous-unité inhibitrice. La nucléase DFF40 est complexée à la protéine inhibitrice de 45kDa DFF45 et CAD est complexée à ICAD ; ces deux complexes comportent une homologie structurale de 75% (160-162).

L'activation de ces endonucléases se produit pendant l'apoptose par clivage de la sous-unité inhibitrice par les caspases effectrices. L'endonucléase ainsi libérée va générer des fragments d'ADN de 180 paires de bases visualisables sur gel d'agarose sous la forme d'un profil de bandes multiples connu sous le nom d'échelle d'ADN (DNA ladder)(163).

Certains membres de la famille Bcl-2 peuvent également être la cible des caspases ce qui assure leur activation, c'est le cas de la protéine Bid clivée par la caspase-8 dans certaines conditions (164-165).

Un autre substrat très étudié est la poly (ADP-ribose) polymérase ou PARP-1(166). Cette protéine enzymatique de ~ 116 kDa est constituée d'un domaine catalytique dans la région C-terminale et d'une partie N-terminale qui comprend : le site de liaison à l'ADN, le site de clivage des caspases et deux motifs en doigts de zinc indispensables pour les interactions protéine-protéine. Dans des conditions normales, l'enzyme inactivée réside dans le nucléoplasme et, en réponse à des lésions sur l'ADN, PARP-1 est recrutée. Elle devient active en se liant à l'ADN et permet alors sa réparation en synthétisant de longs polymères d'ADP-ribose. Elle fait partie de la superfamille des enzymes utilisant le NAD⁺ (nicotinamide adénine dinucléotide) comme substrat pour transférer l'ADP-ribose sur les protéines génomiques.

La PARP-1 semble jouer un rôle important au cours de l'apoptose ainsi qu'au cours de la nécrose. Pendant l'apoptose, la PARP-1 est clivée par des protéases telles que les caspases 3 ou 7, qui dissocient son domaine catalytique de son domaine régulateur (167-169). Dans ces conditions son domaine régulateur de liaison à l'ADN reste fixé sur le matériel génétique, empêchant toute autre réparation. De plus, la réparation de l'ADN par PARP-1 nécessite une consommation importante de NAD⁺ et son activité excessive peut provoquer une déplétion de ce di nucléotide et perturber le métabolisme énergétique de la cellule en limitant la synthèse d'ATP (169-170). Ceci est observé lorsque les lésions sur l'ADN sont sévères. La PARP-1 est suractivée et la quantité de NAD⁺ dans la cellule diminue fortement amenant celle-ci à une mort par nécrose. Outre son action sur la réparation de l'ADN, PARP-1 est impliquée dans la modulation de la chromatine, la régulation de la transcription et le contrôle de la division cellulaire (171).

Enfin, les caspases ne sont pas seulement des enzymes de dégradation mais aussi des molécules de signalisation rigoureusement régulées contrôlant des processus biologiques impliqués dans la physiologie et la pathologie cellulaire.

Les protéines La famille de bcl-2

La famille de bcl-2 comprend une trentaine de membres protéiques régulateurs de l'apoptose dont le nombre est en croissance constante. Ces protéines sont d'authentiques senseurs internes qui intègrent le stress consécutif au dérèglement de l'homéostasie cellulaire et le

transférère à la mitochondrie. Si l'on se réfère à leur fonction biologique ainsi qu'à leur structure protéique, les protéines de la famille Bcl-2 peuvent être classées en trois groupes: les protéines Bcl-2 pro-apoptotiques « Bax-like » (Bax, Bak, Bok, etc.) de localisations subcellulaires différentes, les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl, etc.). Le dernier groupe appelé *BH3-only*, constitué de protéines pro-apoptotiques (Bad, Bid, Bik, Bim, Noxa, Puma, Bmf, Bcl-G, etc.) caractérisées par la présence d'un seul et unique motif BH (Bcl-2 Homology domain), le domaine central BH3. D'autres protéines de cette famille ont été identifiées et ralliées sous le nom de membres orphelins (bcl-G, Bfk, etc) car leurs propriétés pro/anti-apoptotique aussi bien que leurs fonctions physiologiques sont peu élucidées (172).

Ces protéines sont caractérisées par la présence d'un ou plusieurs domaines BH, (le BH3 étant commun à tous les membres de cette famille), et possèdent toutes à l'exception de Bad et Bid un domaine transmembranaire leur permettant de s'insérer dans les membranes des organites cellulaires (La membrane externe de la mitochondrie, réticulum endoplasmique et le noyau)(173).

La principale propriété des protéines de la famille bcl-2 est leur capacité de former des homo ou hétérodimères grâce à leur domaine BH3, d'ailleurs la préservation de la survie ou la bascule vers la mort des cellules semble être étroitement liée aux types et aux proportions des dimères anti ou proapoptotiques. De manière globale, les membres anti- apoptotiques de la famille bcl-2 interagissent avec les protéines pro-apoptotiques ordinairement localisées dans le cytoplasme et répriment leur activation et leur oligomérisation préjudiciable à la membrane externe de la mitochondrie. Les signaux de stress perçus par les protéines pro-apoptotiques lèvent cette répression, entraînant ainsi des dommages aux mitochondries et la libération de protéines apoptogènes (174).

Les protéines apoptogènes issues de la mitochondrie

L'atteinte de la mitochondrie s'associe à la perturbation du fonctionnement des canaux anioniques voltage-dépendant ou VDAC localisés au niveau de la membrane externe et l'incapacité de l'échange des ions (H⁺) et de l'ATP entre la mitochondrie et le cytoplasme contribue à l'hyperpolarisation de la mitochondrie et dérèglement de son activité (175-179). Le dysfonctionnement mitochondriale est un carrefour de passage de plusieurs voies de mort cellulaire qu'elles soient dépendantes ou indépendantes des caspases. Sa participation à

l'apoptose est médiée par ces propres protéines notamment celles localisées dans l'espace intermembranaire.

Les signaux de stress qui convergent vers la mitochondrie entraînent une modification de la perméabilité de la mitochondrie qui se traduit par : l'effondrement du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$)(177-178), un déséquilibre des échanges ioniques et le gonflement de la matrice mitochondriale, la rupture du métabolisme énergétique, la formation de radicaux libres lors du découplage de la chaîne respiratoire, l'augmentation de la concentration de Ca^{++} intracellulaire et la libération de facteurs apoptotiques séquestrés dans la matrice *via* les mégapores mitochondriaux, comme le cytochrome c, des pro-caspases (2, 9), AIF (*Apoptosis inducing factor*), Smac/Diablo (*Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP binding protein and low pI*) OMI/HTRA2 (*high temperature requirement protein A2*) (L Galluzzi 2012) qui véhiculent la cascade des événements conduisant à l'apoptose (180)..

Cytochrome c (Cyt-c) est une hémoprotéine apoptogène localisée dans la chaîne respiratoire mitochondriale où elle assure le transfert des électrons entre les complexes III et IV. Elle est sous forme soluble dans l'espace inter-membranaire. Une fois libéré dans le cytosol, le Cyt-c interagit avec la protéine Apaf-1 et la pro-caspase-9, également libérée par la mitochondrie, en présence d'une molécule de dATP. L'ensemble constitue un complexe multi-protéique appelé apoptosome à l'origine du clivage et de l'activation de la pro-caspase 9. Cette dernière activera à son tour d'autres caspases effectrices comme les caspases 3 ou 7 (181).

Smac/Diablo est une protéine liée, dans les conditions physiologiques, à la membrane mitochondriale sous forme de précurseur de 27 kDa. Le stress active les protéines Bax et Bak (proapoptotiques de la famille Bcl-2) qui intègrent la membrane externe de la mitochondrie où ils construisent des pores multidimériques qui facilitent la sortie de Smac/Diablo comme celle du Cyt-c. Il a été rapporté que la sortie de Smac/Diablo est conditionnée par celle du Cyt-c. En effet, chez les animaux invalidés pour le Cyt-c Smac/Diablo n'est pas libéré dans le cytoplasme après des stimuli proapoptotiques (182-183). Dans le cytoplasme Smac/Diablo va bloquer un groupe de protéines inhibitrices des caspases, les IAPs (inhibitor of apoptosis proteins), par son interaction avec le XIAP (X chromosome-linked inhibitor of apoptosis) au niveau des domaines BIR2 et BIR3 (baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat). S'ensuit une

libération des caspases, qui étaient inhibées par ces molécules, et une activation de la mort cellulaire (184).

OMI/HTRA2 est une protéase à serine confinée dans l'espace inter-membranaire sous forme d'un précurseur de 49 kDa. Comme les autres facteurs apoptogènes, elle est déversée dans le cytosol sous forme de protéine mature de 37 kDa après un stress cellulaire. A l'instar de Smac/Diablo elle se lie aux IAPs facilitant l'activation des caspases. Néanmoins OMI/HTRA2 peut être impliquée dans l'apoptose caspase indépendante, en raison de sa fonction de protéase à sérine par exemple lors de sa surexpression dans les conditions de stress du réticulum endoplasmique (185).

Endonucléase G, aussi connue sous le nom d'endoG, est une protéine de 33 kDa impliquée dans la réplication du génome mitochondrial. Après un stimulus apoptotique, elle s'échappe de la mitochondrie et est relocalisée dans le noyau où elle va dégrader l'ADN double brin et simple brin en fragments de haut et faible poids moléculaire. L'action d'endoG est totalement indépendante des voies des caspases (186-187).

AIF« Apoptosis Inducing Factor » a été identifié depuis une quinzaine d'années par l'équipe de Guido Kroemer. Le gène d'AIF est localisé sur le chromosome X et code pour une protéine précurseur de 613 acides aminés (~ 67 kDa) qui est synthétisée dans le cytosol puis s'intègre à la membrane interne de la mitochondrie (188-191).

AIF est une flavoprotéine, ubiquitaire, constituée de trois domaines : le N-terminal contenant la séquence d'adressage à la mitochondrie (MLS), un domaine central de 27 acides aminés et un domaine C-terminal à activité oxydoréductase carboxy-terminal de 485 acides aminés (192-193). Dans les conditions physiologiques elle a une activité oxydoréductase FAD-dépendante contribuant à la chaîne respiratoire mitochondriale en tant qu'accepteur/donneur d'électrons et catalyseur de la synthèse des espèces réactives de l'oxygène en présence de son cofacteur FAD. L'induction de l'apoptose par différents agents tels que la céramide, la staurosporine ou le MNGN entraîne une perméabilisation de la membrane mitochondriale. L'AIF est alors clivé et libéré sous sa forme soluble appelée AIF tronqué tAIF de 57kDa. Les protéases impliquées dans ce clivage sont la calpaïne 1, la cathepsine B, L et S. L'AIF mature ainsi libéré par la mitochondrie va se transloquer dans le noyau pour condenser la chromatine périphérique et promouvoir la fragmentation de l'ADN génomique (194). Des études

récentes dans le cerveau ont révélé l'existence d'un deuxième pool d'AIF mature dans la membrane externe de la mitochondrie du côté cytoplasmique qui peut être libéré de la mitochondrie, sans être clivé, et ensuite être transloqué dans le noyau et induire la mort cellulaire (195) L'implication d'AIF dans la mort cellulaire indépendante des caspases a été amplement démontrée dans plusieurs systèmes et types cellulaires : des modèles de dommages de l'ADN, les pathologies hépatiques, des modèles de cellules cancéreuses, les maladies neurodégénératives, etc. (plusieurs centaines de références sur Medline)(178).

Le pouvoir apoptogène d'AIF a suscité l'intérêt de nombreuses investigations *in vivo* aussi bien qu'*in vitro*. Il a été montré que la libération d'AIF était modulée par la protéine chaperonne, heat shock protein70 (Hsp70). En effet, cette protéine est réputée pour son pouvoir cytoprotecteur contre le stress et l'apoptose qui s'exprime par son interaction avec les acteurs de la machinerie apoptotique comme Bax, qui facilite la sortie d'AIF de la mitochondrie vers le cytoplasme(196). Ceci empêche AIF d'exercer ses fonctions apoptotiques. De plus, Hsp70 induit la surexpression des protéines anti-apoptotiques de la famille bcl2 qui s'opposent à la libération d'AIF de la mitochondrie et par conséquent à l'induction de la mort cellulaire (197). Il a été également rapporté qu'AIF amplifie le processus de sa propre libération et celle d'autres protéines (Cyt c et pro-caspases) en favorisant la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (198).

L'activité de dégradation de l'ADN médiée par AIF dépend du recrutement des endonucléases car il est lui-même dépourvu de cette propriété enzymatique. Il a été observé une interaction directe entre AIF et la cyclophilin A ou endoG (l'interaction avec cette dernière a été observée chez *Caenorhabditis elegans*) (199-200). De même, des travaux réalisés dans notre laboratoire ont montré que la L-DNase II collabore avec AIF. Il a été observé que les deux molécules peuvent interagir physiquement et que *in vitro* la combinaison d'AIF et de la L-DNase II a pour conséquence une dégradation de l'ADN plus importante que la L-DNase II seule. De plus, AIF combiné à la L-DNase II condense davantage la chromatine qu'AIF seul. Enfin AIF et la L-DNase II colocalisent dans certains modèles cellulaires d'apoptose indépendante des caspases et collaborent pour induire la mort cellulaire (201).

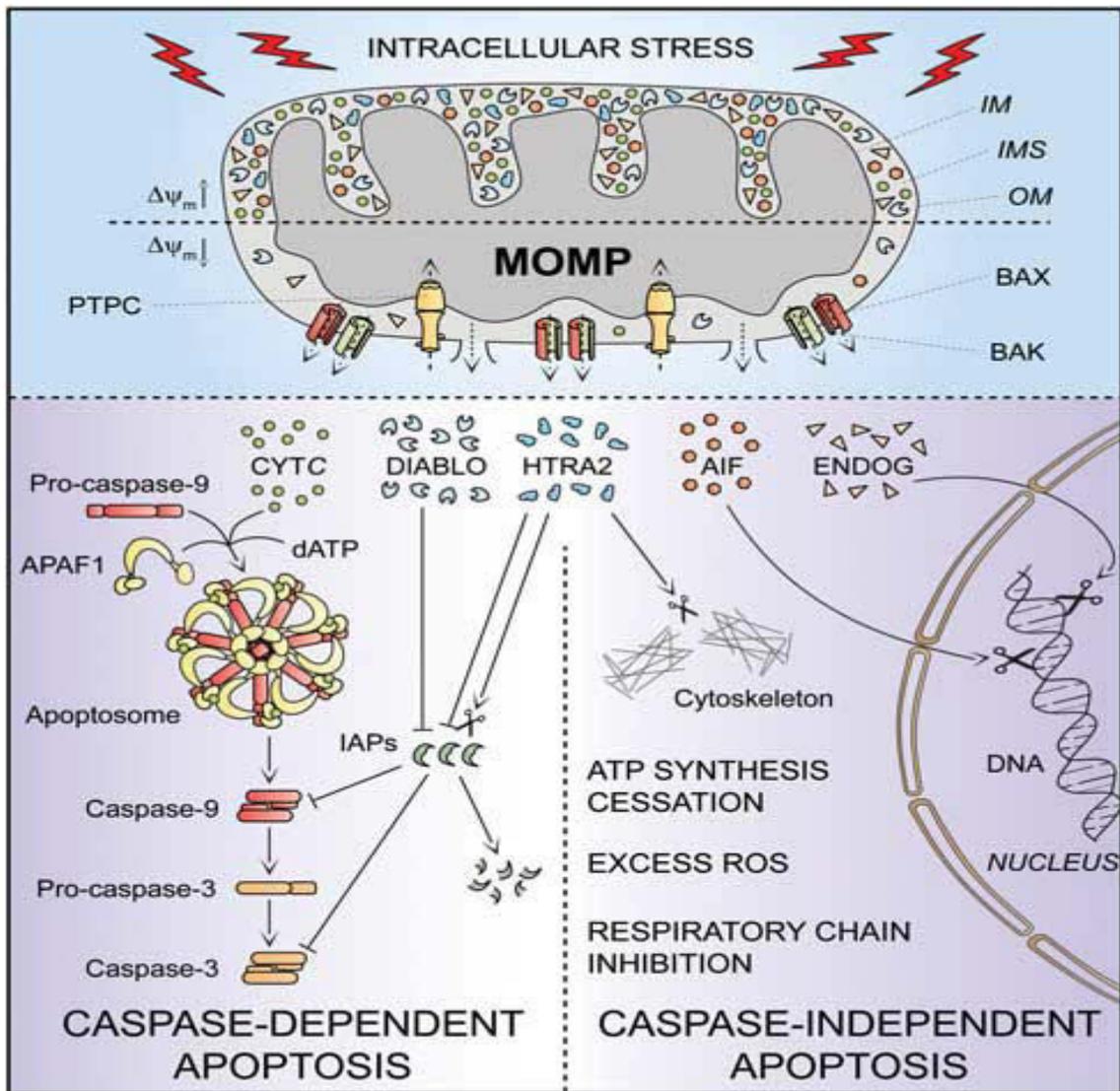


Figure 25 : L'apoptose orchestrée par la mitochondrie par l'intermédiaire des protéines apoptogènes mitochondriales. Le stress cellulaire transite par la mitochondrie et provoque la chute de son potentiel membranaire et la libération des protéines proapoptotiques qui conduisent la cellule vers une mort dépendante ou indépendante des caspases. (D'après L.Galluzzi et al.2012)

Les calpaïnes sont des endoprotéases à cystéine situées à l'état natif dans le cytoplasme et associées à la membrane des organites. La famille des calpaïnes comprend une quinzaine de membres, les uns sont ubiquitaires alors que d'autres sont spécifiques à certains tissus. Les calpaïnes les mieux étudiées sont la calpaïne 1 et 2. Celles-ci s'activent sous l'influence d'une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et agissent à pH neutre. Néanmoins, les concentrations de calcium requises pour l'activation de chacune de ces protéases sont très différentes. La calpaïne 1 connue aussi sous le nom micro-calpaïne est activée à des concentrations entre 3 et 50 μM de $[\text{Ca}^{2+}]$ tandis que la calpaïne 2 ou milli-calpaïne est activée à des concentrations entre 0.2 et 1 mM de $[\text{Ca}^{2+}]$. Les deux enzymes ont un grand nombre de substrats communs probablement à cause de leur site de clivage très

semblable entre les deux protéases. Elles peuvent néanmoins avoir une spécificité pour certains substrats. Il a été montré que dans des situations de stress les calpaïnes clivent diverses protéines, entre autres AIF, qui est libéré sous sa forme tAIF apoptogène. Elles activent également les caspases 3 et 9 ainsi que Bax qui à son tour exacerbe la perméabilisation mitochondriale (202-203).

Les cathepsines (Voie lysosomale) sont des endopeptidases lysosomale impliquées dans la mort cellulaire par apoptose et la nécrose. Elles sont synthétisées sous forme de proenzyme inactive dans le réticulum endoplasmique rugueux, leur structure est complétée par la suite dans l'appareil de Golgi puis elles rejoignent l'espace endolysosomal où l'environnement est favorable à leur activité catalytique. Elles se divisent en trois groupes selon le résidu présent dans le site actif : les protéases à cystéine de la famille des papaines (cathepsines B, C, F, H, K, L, N, O, S, T, U, W et X), les protéases à aspartate de la famille des pepsines (cathepsine D et E) et les protéases à serine (cathepsine A et G). (204). Elles jouent un rôle majeur dans la dégradation et le recyclage des protéines cellulaires. Leur activité optimale est observée à pH acide dans les lysosomes, toutefois plusieurs d'entre elles sont activées à pH neutre même si leur stabilité et spécificité sont amoindries ce qui expliquerait leur participation à de nombreux phénomènes physiologiques (la morphogénèse, le cycle cellulaire, la maturation des antigènes pour la présentation par le MSH *complexe majeur d'histocompatibilité*) et apoptotiques (205).

En effet, plusieurs études ont montré que certaines cathepsines sont capables de cliver Bid en tBid (Cathepsine B, L, etc.) ce qui déstabilise la membrane mitochondriale et conduit à la sortie des protéines pro-apoptotiques et à la dégradation des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Les cathepsine D et la G provoquent le changement de conformation d'une protéase cytosolique (Leukocyte Elastase Inhibitor décrite en détail par la suite) en une endonucléase L-DNase II qui se transloque dans le noyau et le dégrade l'ADN(204).

Recentement, une étude a montré l'implication de la calpaïne 1, la cathepsine D et la L-DNase II dans la mort cellulaire. Il a été observé, dans des cellules HeLa et des fibroblastes traités avec la ciprofloxacine ainsi que dans un modèle de dégénérescence rétinienne induite par la lumière, que la calpaïne 1 provoque le clivage de la protéine LAMP 2 (lysosomal associated membrane protein 2) ce qui déclenche la perméabilisation des lysosomes et la libération de la cathepsine D, qui à son tour, active la voie de la LEI/L-DNase II.(206-208).

Les Granzymes induisent la mort par apoptose médiée par des effecteurs cellulaires du système immunitaire. Ils font partie de la famille trypsin-like et leur pic d'activité s'observe à pH neutre. Onze granzymes ont été caractérisés chez la souris A, B, C, D, E, F, G, K, L, M et N, mais uniquement cinq sont décrites chez l'Homme: A, B, H, K et M (209). Les granzymes sont séquestrées dans des granules cytosolique des cellules NK (Natural Killer) et les lymphocytes T cytotoxiques qui les emploient pour induire l'apoptose dans les cellules infectées par des virus et /ou les cellules cancéreuses (209).

Les granzymes sont transférées des cellules immunitaires au cytoplasme de la cellule cible via la perforine, une protéine permettant la création d'un pore dans les cellules cibles. Une fois à l'intérieur de la cellule, elles activent l'apoptose par le clivage des caspases et d'autres protéines qui assurent l'intégrité de l'ADN et la mitochondrie.

Les granzymes les plus abondantes sont les protéases à serine A et B. La granzyme B déclenche l'apoptose caspase dépendante par clivage direct des caspases, mais aussi peut promouvoir l'apoptose caspase indépendante via la perméabilisation mitochondriale. Quant à la granzyme A, elle induit seulement l'apoptose caspase indépendante (210-212).

Les endonucléases

La dégradation de l'ADN est la particularité morphologique la plus couramment visualisée pour détecter la mort cellulaire par apoptose. Elle s'opère grâce aux endonucléases qui hydrolysent l'ADN du génome. La dégradation nucléaire pendant l'apoptose est un phénomène bénéfique qui permet de prévenir le transfert des gènes potentiellement défectueux aux cellules avoisinantes comme les gènes viraux ou les oncogènes (213-215). Elle rend aussi plus facile la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages et empêche ainsi la production d'auto-anticorps anti-chromatine à l'origine de maladies auto-immunes (216).

L'ADN subit deux types de fragmentations majeures durant l'apoptose. Tout d'abord l'ADN est dégradé par des endonucléases telles que la cyclophyline, l'endo G et même la L-DNase II qui engendrent des fragments de haut poids moléculaire allant de 50 à 300 kb détectables sur gel à champ pulsé (217). Dans un second temps ces grands fragments subissent un fractionnement internucleosomal ce qui donne naissance à des fragments d'ADN plus petits de 180-200 bp (218). Ces derniers forment une migration semblable à une échelle après électrophorèse sur gel d'agarose. Il est connu que dans les régions riches en GC, la chromatine a une conformation plus ouverte et donc ces régions sont préférées par les

endonucléases (218). Du point de vue de leurs conditions d'activation, les endonucléases peuvent être divisées en trois groupes : les endonucléases Ca^{2+} Mg^{2+} dépendantes, les endonucléases Mg^{2+} dépendantes et les endonucléases cations indépendantes (219).

Endonucléases Ca^{2+} et Mg^{2+} dépendantes (La famille des endonucléases de type des DNase I)

Cette famille d'endonucléases rassemble des endonucléases dont l'activité dépend de la présence synergique de calcium et de magnésium et d'un pH neutre pour dégrader l'ADN. L'endonucléase la mieux caractérisée dans ce groupe est la DNase I. Elle génère des oligonucléotides avec des extrémités 3'-OH/5'-P. Elle a été impliquée dans la dégradation internucléosomale de l'ADN pendant l'apoptose induite par différents stimuli tels que l'étoposide, la cycloheximide, l'actinomycine D et le taxol (mais seulement en conditions de surexpression). Elle est inhibée par des concentrations milli molaire de Zn^{2+} et les chélateurs de cations. D'autres endonucléases appartiennent à cette famille, comme la DNase L1, DNase L2, DNaseX. Toutes ne sont pas nécessairement impliquées dans l'apoptose (220).

Endonucléases Mg^{2+} dépendantes

L'endonucléase la mieux caractérisée et la plus étudiée dans ce groupe est la DFF40/CAD ou CAD. Cette endonucléase de 40 kDa est activée lors de l'apoptose caspase dépendante, en présence de Mg^{2+} et clive uniquement l'ADN double brin (221). CAD forme un complexe avec ICAD (inhibitor of CAD), connu également comme DFF45. Lors de l'activation des caspases, la caspase 3 et la caspase 7 clivent ICAD dans deux sites libérant ainsi CAD qui sera transloquée dans le noyau grâce à son site de nucléarisation. Une fois dans le noyau CAD dégrade l'ADN et génère des oligonucléosomes de 180 paires de bases avec des extrémités 3'-OH/5'-P. Le clivage de l'ADN par CAD est stimulé par des protéines de la chromatine comme l'histone1 et la topoisomérase II (222).

La dégradation de l'ADN exécuté par ces endonucléases est un marqueur de l'apoptose souvent évalué dans la recherche par la méthode TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling). Cette technique permet de marquer les extrémités 3'-OH/5'-P, signature de l'action des endonucléase de types DNase I. Cependant, elle est complètement inopérante quand l'enzyme activée produit d'autres fragments comme c'est le cas pour les endonucléases indépendantes des cations.

Endonucléases indépendantes des cations (La famille des endonucléases de type des DNase II)

Les membres de cette famille se distinguent des autres endonucléases par une activité enzymatique optimale à pH acide, elles n'ont pas besoin d'ions pour leur fonction

hydrolytique sur l'ADN, elles provoquent des coupures sur l'ADN simple et double brin avec une production prédominante des extrémités 3'P/5'OH. À cette famille d'endonucléases appartiennent la DNase II α , la DNase II β , et la L-DNase II.

La DNase II α (40 à 46 kDa) est une endonucléase ubiquitaire exprimée dans tous les tissus chez les mammifères. C'est un constituant majeur des lysosomes où elle dégrade l'ADN des corps apoptotiques englutis par les cellules phagocytaires avec une cinétique d'action maximale à pH 4,6 à 5. Elle est impliquée dans de nombreux processus physiologique et dans l'apoptose (219, 221, 223). La DNase II β est une enzyme intracellulaire qui exprimée dans différents tissus de l'organisme avec une abondance marquée au niveau des glandes salivaires. Elle est activée pendant la différenciation terminale du cristallin chez la souris et chez l'homme (221, 224).

Dans notre laboratoire une endonucléase de type DNase II a été caractérisée et appelée L-DNase II. In vitro elle a une activité optimale à pH acide mais elle conserve la moitié de son activité à pH neutre(225).

La voie de la LEI/L-DNase II

La Leucocyte Elastase Inhibitor LEI ou serpine B1, est une antiprotéase ubiquitaire qui appartient à la superfamille des serine protease inhibitors (serpines). Elle a été isolée à partir des monocytes humains et de leucocytes équins comme inhibiteur cytosolique de l'élastase avec laquelle la LEI forme un complexe covalent (226).

La famille des serpines compte actuellement plus des 1500 membres repartis en fonction de leurs relations phylogéniques en 16 classes plus une classe de serpines orphelines (A-P)(227-228). La plupart des serpines sont impliquées dans la régulation extracellulaire des protéases à serine excepté les serpines appartenant au groupe B comme la LEI qui ont une activité enzymatique intracellulaire parce qu'elles sont dépourvues du peptide signal de sécrétion (229).

L'action inhibitrice de la LEI n'est pas limitée à l'élastase car elle bloque aussi les cathepsines G et D, la protéinase 3, l'AP24 et probablement d'autres protéases(230). Par conséquent il est fort raisonnable de penser que la LEI native capable d'inhiber les protéases à serine ou à cystéine protège la cellule de ses propres enzymes, potentiellement toxiques, en les neutralisant suite à une activation accidentelle ou une fuite hors des granules de stockage (lysosomes, caspase-8) (230-231).

Toutefois, La grande flexibilité génétique et structurale a permis à certaines serpinines d'évoluer comme protéines non inhibitrices. De ce fait on rencontre parmi elles des protéines chaperonnes (Hsp47), des régulateurs de la pression artérielle (angiotensinogène) et des transporteurs d'hormone (corticostéroïde binding globulin) (232-233). Les serpinines jouent un rôle clé dans innombrables fonctions physiologiques et leur importance est soulignée par les maladies associées à une perte de fonction de certaines d'entre elles, à titre d'exemple : la thrombose (antithrombine), la démence (neuroserpine) et elles sont aussi impliquées dans la mort cellulaire par apoptose (Maspin, MENT: *Myeloid and erythroid Nuclear Termination stage-specific protein* (234-235)).

Les serpinines ont une structure commune qui comprend trois feuillets β (la LEI possède deux feuillets) entourés de 8 à 9 hélices. Dans leur forme native elles ont une boucle réactive dans la région N-terminale exposée en surface ce qui constitue un piège pour les protéases cibles. Quand la protéase coupe la boucle en un site précis (P1-P1') il s'ensuit une modification conformationnelle de la serpinine: la moitié N-terminale de la boucle réactive se replie et s'insère dans le feuillet β principal grâce à une région charnière très conservée qui constitue la « Signature des serpinines »(236). Ces événements post clivage entraînent une perte de l'activité inhibitrice de la protéine (229, 231).

La LEI a une caractéristique très particulière par rapport aux autres serpinines : le changement de conformation ne la rend pas complètement inactive du point de vue enzymatique mais lui confère une autre activité et une autre localisation. Alors que la protéine native a un poids moléculaire apparent de 42 kDa et une localisation cytoplasmique, la protéine clivée, la L-DNase II, a un poids moléculaire apparent de 35 kDa et une localisation nucléaire. Une fois qu'elle a fragmenté l'ADN elle a un poids moléculaire apparent de 27 kDa (Figure 22) (225, 229). La LEI native a une activité anti-protéase, la protéine clivée perd cette activité et présente une activité endonucléase (L-DNase II). Dans la cellule la LEI exerce une double fonction tributaire du microenvironnement dans lequel elle se trouve ; la LEI, cytoplasmique, a des propriétés anti-apoptotiques alors que la L-DNase II, nucléaire, se présente au contraire comme une enzyme pro-apoptotique (Figure 23). Cette endonucléase est indépendante des cations et a une activité optimale à pH acide (5.75 in vitro), cependant elle reste active à pH neutre et garde 50% de son activité à pH 7.4. Elle peut être inhibée par le zinc comme d'autres endonucléases (219, 237-238).

Il a été prouvé que la L-DNase II possède une séquence consensus d'importation nucléaire bipartite ou nuclear localisation signal (NLS) qui est reconnue par les importines. C'est la L-

DNase II, et non pas la LEI, qui est importée dans les noyaux puisque dans la LEI ce NLS est partiellement masqué par la boucle réactive. Des expériences ont montré une liaison entre la L-DNase II et l'importine la responsable son importation nucléaire (229). En plus du NLS, la LEI/L-DNase II contient un signal d'exportation nucléaire, nuclear export signal (NES), riche en leucine et une mutation de ce site dans la LEI/-DNase II provoque son accumulation dans le noyau (239).

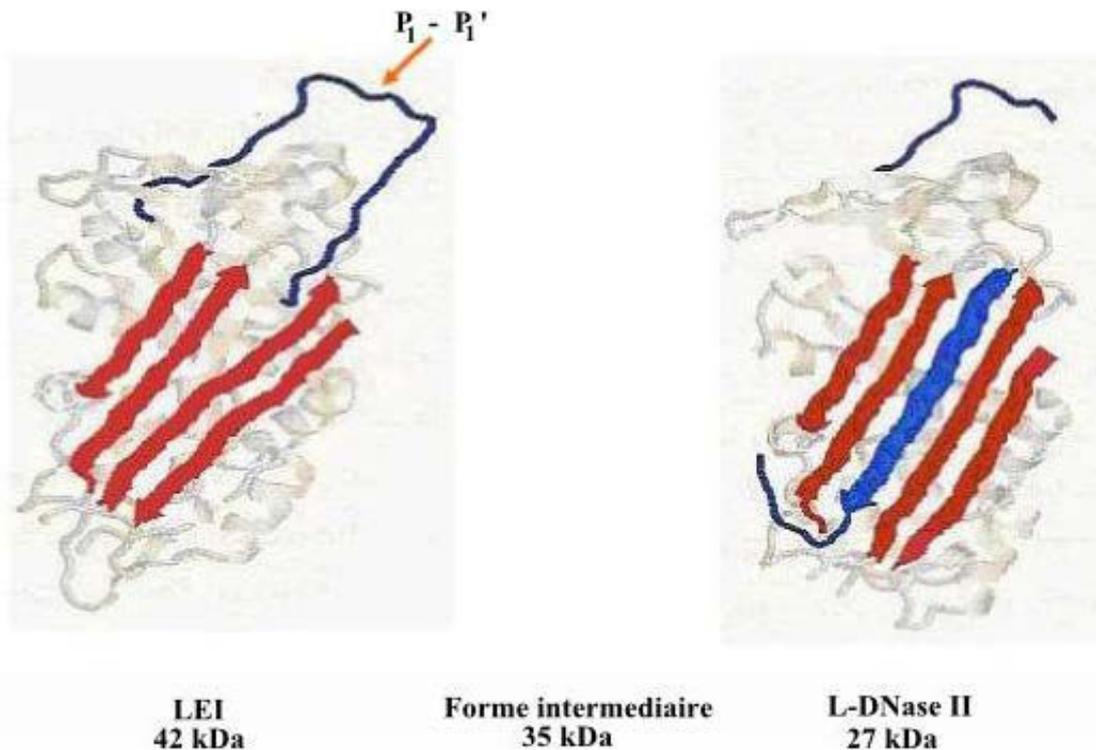


Figure 26 : La LEI/L-DNaseII. La LEI a un poids moléculaire apparent de 42 kDa, une fois clivée elle est transformée en L-DNase II qui a un poids moléculaire apparent de 35 kDa. La L-DNase II qui a déjà clivé l'ADN a un poids de 27 kDa. En rouge le feuillet β , en bleu la boucle réactive.

L'activation de la L-DNase II a été mise en évidence, pour la première fois, dans une étude faite chez le poulet au cours de la différenciation terminale des cellules du cristallin. Dans ce processus les cellules perdent leur noyau pour devenir transparentes(240). De plus, l'implication de la L-DNase II dans les mécanismes d'apoptose de la rétine a été découverte d'abord chez le poulet. Pendant le développement, la neurorétine perd 50% de neurones par apoptose. A E11, où a lieu le pic d'apoptose, une activité endonucléase de la L-DNase II est détectée et sa présence est observée, par immunohistochimie, dans les noyaux des cellules ganglionnaires et dans les couches nucléaires interne et externe (241). En suite, plusieurs modèles d'étude d'apoptose in vitro ont montré une activation de la L-DNase II : apoptose

induite dans des cellules HeLa (carcinome du col de l'utérus) et SW613-S (carcinome du colon) par épuisement du milieu de culture (épuisement des nutriments) (242-244), apoptose induite dans des cellules L-1210 (leucémie murine) par la staurosporine (245), apoptose induite dans des cellules ARPE19 (épithélium pigmentaire de la rétine) par l'éthanol (246) Enfin, plus récemment, l'apoptose induite par les glucocorticoïdes (la Triamcinolone Acétonide) dans les néovaisseaux de la rétine du rat et les cellules endothéliales de la rétine bovine (121).

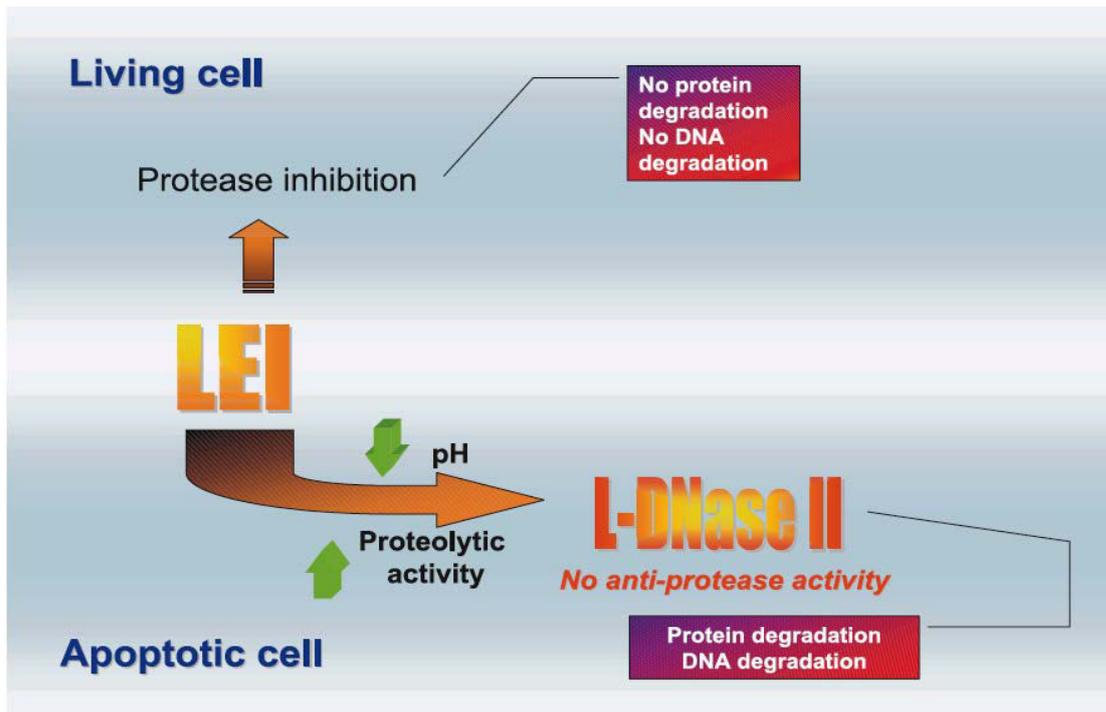


Figure 27 : Le rôle de la LEI/L-DNaseII dans la mort par apoptose. Dans la cellule saine la LEI est sous sa forme native et joue un rôle protecteur en faveur de la survie cellulaire. Lorsqu'elle est clivée, elle change de conformation et se transforme en une L-DNase II a potentiel apoptogène. La L-DNase II va se transloquer dans le noyau et le dégrader l'ADN (D'après Counis and Torriglia 2000).

- **3.2.3.2. Voie apoptotique extrinsèque**

L'expression « apoptose extrinsèque » indique la mort induite par des signaux extracellulaires reconnus et propagés dans la cellule par l'intermédiaire des récepteurs membranaires spécifiques. Ces récepteurs sont connus sous le nom de des récepteurs de mort (ou DR pour Death Receptor) de la superfamille du récepteur du TNF- α (Tumor Necrosis Factor). La famille des TNF-R est une famille de plus de 20 membres parmi lesquels le récepteur Fas et TNF-R1 sont plus étudiés et exprimés par la majorité des types cellulaires (138). Ils possèdent un motif intracellulaire riche en résidus cystéines et un domaine intracellulaire DD par lequel il y a recrutement de protéines adaptatrices cytoplasmiques (FADD pour Fas-Associated Death Domain et/ou TRADD pour TNF-R Associated Death Domain), après fixation à leur

ligand. Ceci est suivi du recrutement des procaspases initiatrices 8 et 10. Cet ensemble multiprotéique impliquant ligands–récepteurs protéines adaptatrices et procaspases initiatrices porte le nom de DISC (pour Death-Inducing Signaling Complex). Il s'ensuit l'activation autocatalytique des caspases initiatrices qui précipite la cellule vers une mort inéluctable. Il existe deux principaux scénarios consécutifs à l'activation des caspases initiatrices.

1) Apoptose indépendante de la mitochondrie : activation de la caspase 8 ou 10 \Rightarrow activation des caspases effectrices 3,7. 2) Apoptose dépendant de la mitochondrie : activation de la caspase 8 ou 10 \Rightarrow formation de tBid \Rightarrow Perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie \Rightarrow activation des caspases effectrices 3,7 (138).

- **3.2.3. 3 Voie apoptotique intrinsèque**

Les voies de signalisations inductrices de l'apoptose intrinsèque sont aussi diverses que les stimuli qui les induisent : production des dommages à l'ADN, stress oxydatif, augmentation de la concentration intracellulaire en Ca⁺, surcharge en agent à faible pouvoir excitotoxique (Accumulation des protéines mal conformées). Ces signaux convergent moyennant l'intervention des membres de la famille Bcl-2 qui régulent finement la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. Cette perméabilisation est fréquemment précédée, accompagnée ou suivie d'une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial et aboutit au relargage de facteurs issus de l'espace inter-membranaire mitochondrial : AIF, Smac/Diablo, EndoG, OMI/HTRA2, Cyt c.

Le tout conduit enfin à la mort de la cellule en raison, d'une part, du relargage de facteurs activateurs des caspases ainsi que de molécules effectrices de la mort caspase-indépendante et, d'autre part, d'une altération du métabolisme de la mitochondrie qui est nécessaire à la survie cellulaire.

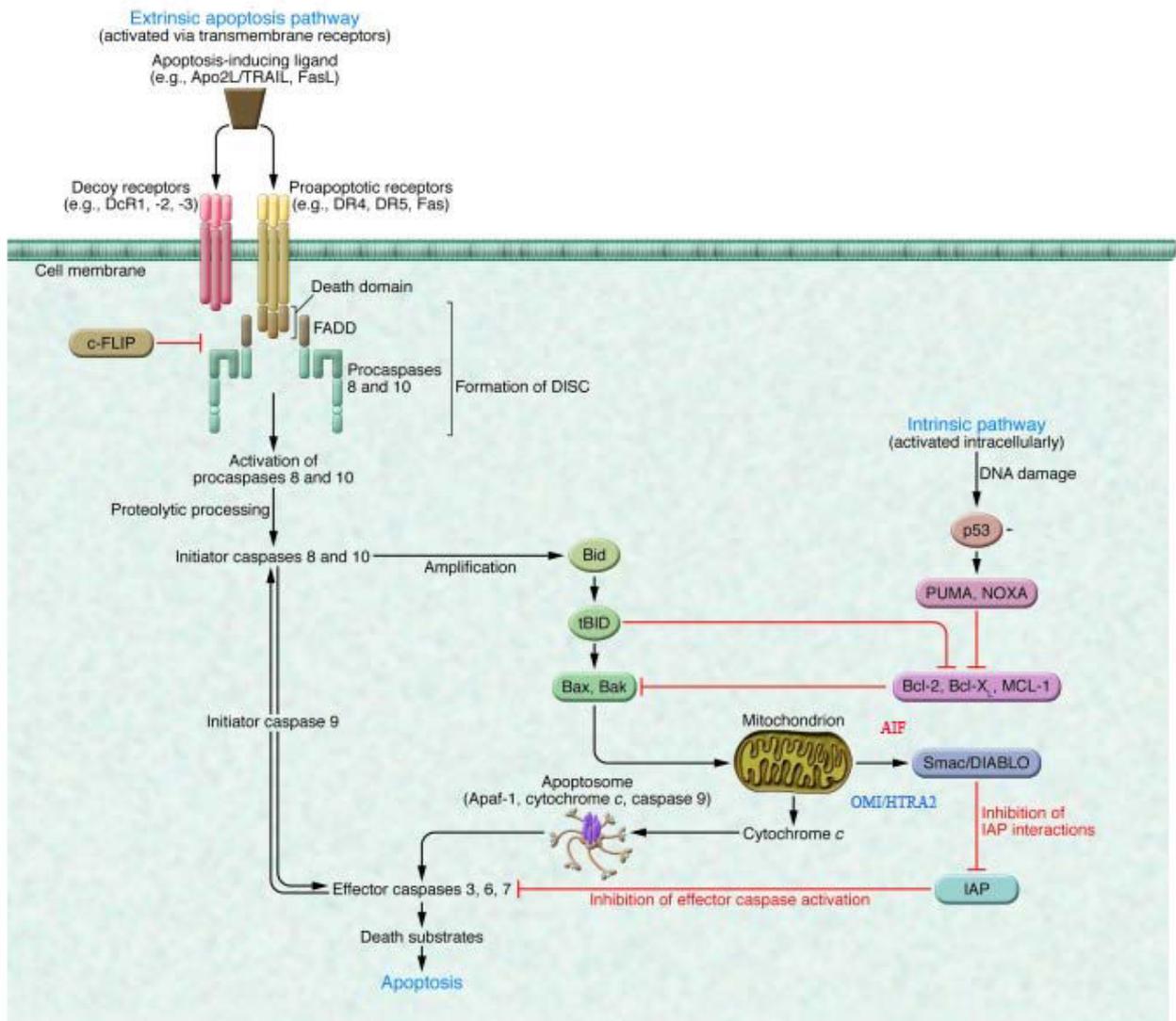


Figure 28 : Les deux voies d'activation de l'apoptose, la voie mitochondriale ou intrinsèque et la voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque. (D'après Ashkenazi A, Herbst RS.2008).

3.2.4 Autres types de mort cellulaire

Les trois types de mort cellulaire précédemment décrits, apoptose, autophagie et nécrose, ne sont pas les seuls mécanismes de mort cellulaire. D'autres ont été décrits.

- **3.2.4.1 La catastrophe mitotique** a lieu lorsque le point de contrôle G₂/M du cycle cellulaire est perturbé par des dommages de l'ADN ou du cytosquelette cellulaire. Il en résulte la formation d'un noyau de morphologie aberrante et fractionnée. Les cellules présentent une structure aplatie avec une désorganisation du réseau squelettique interne. Elles déclenchent finalement la mort cellulaire ou la sénescence mais les mécanismes exacts de ces phénomènes restent peu élucidés (247).

- **3.2.4.2 L'anoikis** est un terme grec qui signifie « Sans abri », il s'agit de l'initiation de la mort par apoptose consécutive à une perte de contact avec la matrice extracellulaire. Elle se caractérise par un manque d'engagement de l'intégrine1, une régression de l'expression du récepteur de l'epidermal growth factor (EGFR), l'inhibition de la signalisation de l'extracellular regulated kinase 1 (ERK1) et la surexpression de bmf un membre de la famille Bcl2.C'est une mort qui prévient la prolifération ectopique des cellules épithéliales et leur migration (248).
- **3.2.4.3 L'entosis** est un mécanisme de mort cellulaire caractérisé par la phagocytose d'une cellule vivante par une autre du même type cellulaire. La cellule phagocytée ne sort pas du phagosome et est dégradée dans le lysosome de la cellule hôte. Elle est insensible aux méthodes chimiques ou génétiques qui normalement bloquent l'apoptose dépendante et indépendante des caspases (249).
- **3.2.4.4 La pharthanatos** est une voie de mort cellulaire qui dépend de l'activation précoce de la poly(ADP-ribose)polymérase 1 (PARP1). Elle présente une diminution importante des concentrations de NAD⁺ et d'ATP intracellulaires. En même temps il y a une chromatinolyse médiée par l'apoptosis inducing factor (AIF). La pyroptosis est un type de mort cellulaire dépendant de la caspase 1 et qui est associée à la génération des médiateurs pyrogéniques comme l'interleukin 1(IL-1 β) et IL-18 (250-251).
- **3.2.4.5 La netosis** est une voie de mort cellulaire qui se présente uniquement dans les granulocytes. Elle est insensible aux inhibiteurs des caspases et à la nécrostatine. Elle dépend de la génération de superoxyde médiée par la NAPDH oxydase et de la machinerie autophagique (252).
- **3.2.4.6 La cornification** est un mécanisme de mort cellulaire restreinte aux kératinocytes. Elle est liée à la génération de stratum corneum de l'épiderme. Elle peut être altérée par la caspase 14 ou par les transglutaminases (253).

But du travail

A la lumière des données rapportées par la littérature et des résultats obtenus dans notre laboratoire, qui décrivent les GCs comme des substances potentiellement toxiques sur les vaisseaux et les cellules endothéliales qui les forment, nous nous sommes posé quatre questions fondamentales, qui ont été le moteur de nos recherches.

- 1- Est-ce que toutes les cellules endothéliales des microcirculations de l'organisme manifestent la même sensibilité au GCs ? réagissent-elles de la même manière aux différents GCs ?
- 2- Est-ce que tous les GCs exercent la même toxicité sur les cellules endothéliales ?
- 3- Existe-t-il des traitements de substitution avec une balance bénéfice risque plus favorable pour les tissus oculaires ?

Chapitre II : Résultats

1 La toxicité des glucocorticoïdes(GCs) sur les cellules endothéliales:

Les GCs sont très souvent des traitements de choix pour de nombreuses pathologies oculaires telles que l'œdème maculaire, les occlusions veineuses, la néovascularisation et les maladies inflammatoires. Toutes ces maladies sont associées à des risques non négligeables sur le pronostic visuel. L'administration des médicaments vers le segment postérieur de l'œil, siège de ces affections, est rendue difficile par la présence de la barrière hématorétinienne qui s'oppose à leur passage. Les GCs sont alors administrés localement, à forte dose, par injection intravitréenne. Curieusement, les résultats anatomiques spectaculaires découlant de l'administration intraoculaire des GCs (Résorption de l'œdème (Figure 29), baisse de l'inflammation, etc.), ne s'accompagnent pas d'une amélioration comparable de la fonction rétinienne car les patients ne récupèrent que partiellement leur acuité visuelle (254). Par conséquent, une éventuelle toxicité des GCs sur les différentes cellules de la rétine a été soupçonnée.

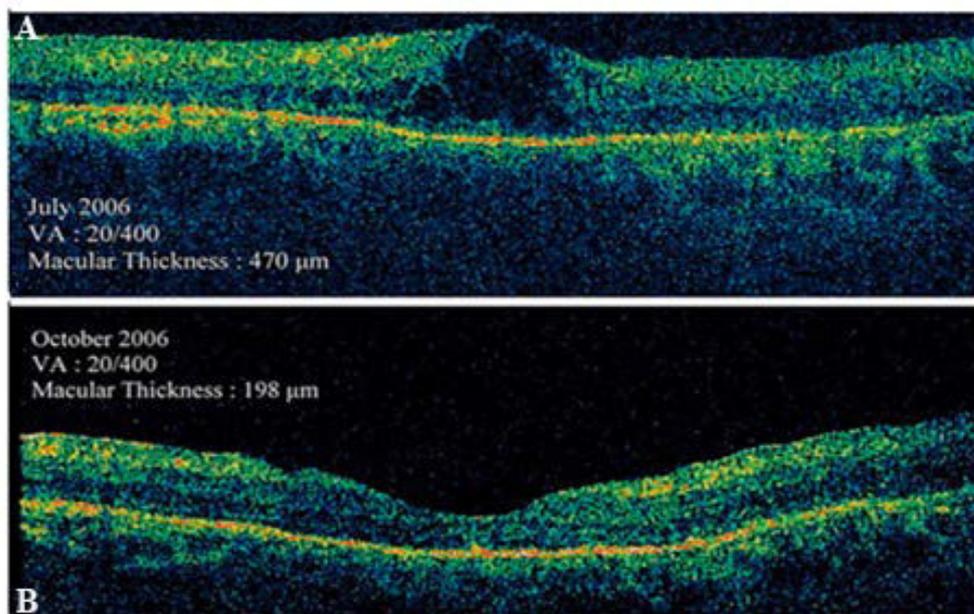


Figure 29 : Examen par tomographie en cohérence optique (OCT) d'un œdème maculaire secondaire à une rétinopathie diabétique. A) l'état de l'œdème avant le traitement B) évolution de l'œdème après injection intravitréenne de la Triamcinolone Acétonide (TA). Une résorption totale de l'œdème a été observée dans l'œil traité par le glucocorticoïde (*D'après Gabriel COSCAS.2011*).

Des travaux préalables dans notre laboratoire ont montré que la Triamcinolone Acétonide(TA) induisait une toxicité à différents niveaux de la rétine : épithélium pigmentaire, cellules gliales de Müller, vaisseaux. Les recherches effectuées ont montré que les réseaux vasculaires étaient particulièrement atteints. *In vivo*, la TA augmentait l'espace péri-vasculaire de la choriocapillaire après 1 mois de traitement, réduisait le diamètre et l'épaisseur du réseau choroïdien (Figures 30, 31) et induisait une vasoconstriction des vaisseaux qui tapissent la rétine. *In vitro*, la TA exerçait une cytotoxicité dose et temps dépendants sur les cellules endothéliales de la rétine bovine et déclenchait dans celles-ci les voies de mort cellulaires caspases indépendantes, la voie LEI/LDNase II et la voie AIF (255).

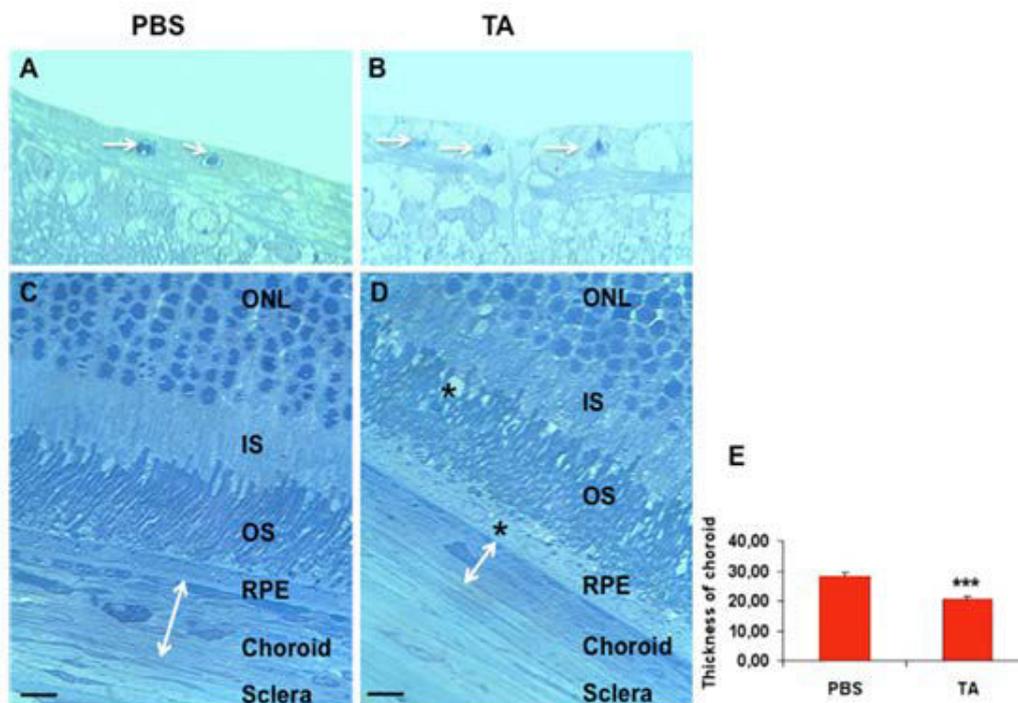


Figure 30 : Analyse d'une coupe semi-fine de la chorioretine 30 jours après traitement avec la TA. Le diamètre des vaisseaux rétiniens a été réduit après injection de la TA par rapport au contrôle PBS (A, B). La TA a induit une diminution significative de l'épaisseur de la chorioretine par rapport à l'œil contrôle(C, D, E).* $P \leq 0.005$ (Valamanesh et al.2009).

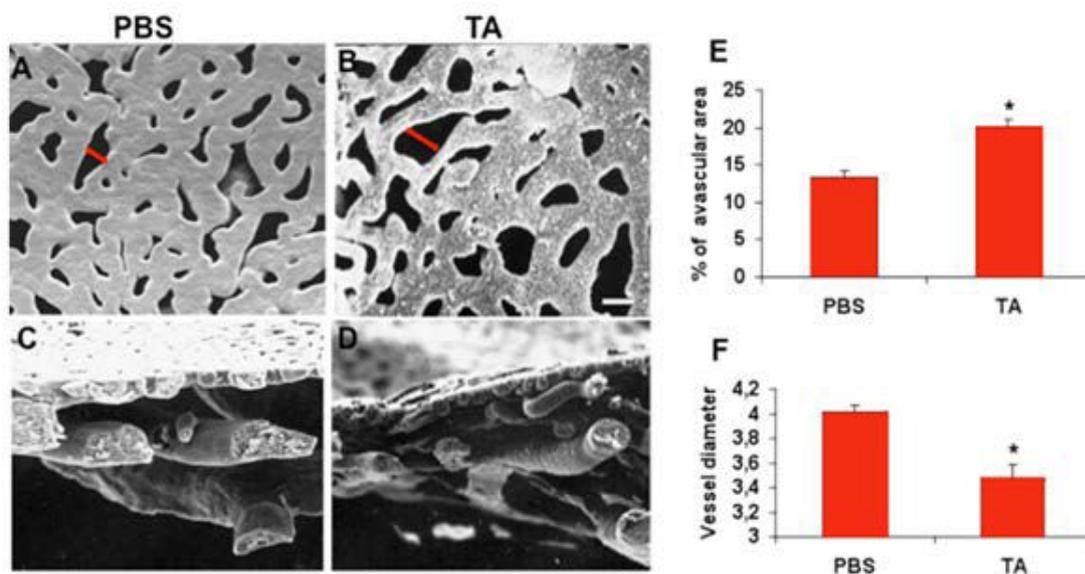


Figure 31 : Vue frontale de moulages choroïde montés 30 jours après l'injection intravitreuse de la TA chez le rat Albinos. Les zones avasculaires sont augmentées (B) dans les yeux traités avec la TA par rapport au contrôle PBS (A). Les coupes transversales et péricentrales des moulages de choroïde (C, D) présentent une réduction de l'épaisseur de la choriocapillaire et (F) montrent que le diamètre des vaisseaux est considérablement réduit après traitement avec la TA. * $P \leq 0.05$ (Valamanesh et al.2009).

Néanmoins, l'ensemble de ces résultats associé aux données cliniques et fondamentales ont soulevé d'autres questions relatives aux mécanismes cellulaires par lesquels cette cytotoxicité s'opère sur l'endothélium microvasculaire.

Nous avons essayé de répondre à ces questions par la réalisation d'une série d'expériences sur les cellules endothéliales *in vitro* et les microvaisseaux de la rétine *ex-vivo* traités par quatre glucocorticoïdes différents et nous avons obtenu les résultats présentés dans l'article suivant.

Glucocorticoids exert direct toxicity on microvasculature: Analysis of cell death mechanisms

Short title: Glucocorticoids toxicity on vascular endothelium.

Ikram El-Zaoui^{1, 2, 3}, Francine Behar-Cohen^{1, 2, 3, 4,*}, Alicia Torriglia^{1, 2, 3*}.

¹INSERM UMRS 872, Team 17 Physiopathology of Ocular Diseases, Therapeutic Innovations, Paris, France.

²Pierre et Marie Curie University, Centre de Recherches des Cordeliers, Paris, France.

³Paris Descartes University, UMRS 872, Centre de Recherches des Cordeliers, Paris, France.

⁴Sorbonne Paris Cité, Paris Descartes University; AP-HP Hôtel-Dieu, Department of Ophthalmology, Paris, France.

* Both authors have contributed equally to the work

Keywords: Glucocorticoids, endothelial cell, retinal microvasculature, apoptosis, dermic endothelial cell.

Correspondence should be addressed to Alicia TORRIGLIA,

Address: Centre de Recherches des Cordeliers, UMRS 872, Team 17 «Physiopathology of ocular diseases: Therapeutic innovations », Pierre et Marie Curie University, Paris. Descartes University; 15 rue de l'école de médecine; F-75006 Paris, France. Tel: +33 1 44 27 81 73

Fax: +33 1 44 27 81 83

E-mail: alicia.torriglia@inserm.fr

Abstract:

Glucocorticosteroids (GCs) are injected systemically or directly into the eye to treat numerous retinal diseases but their potential toxicity on vessels has not been questioned. Our purpose was to study the potential cytotoxicity of the GCs on endothelial cells from the human microcirculation, bovine retinal endothelial cells and, *ex-vivo*, on flat mounted rat retinas. Hydrocortisone, Dexamethasone, Dexamethasone phosphate and Triamcinolone Acetonide were evaluated.

Our results indicate that GCs can induce endothelial cell death. Retinal endothelial cells are less sensitive than microvascular endothelial cells from the skin. Higher hydrophobicity of the GC is associated with increased toxicity. Interestingly, depending on the GCs the mechanisms of cell death were different involving or not activation of caspases. Toxicity observed on cell culture was confirmed on the rat retinal explants. Whilst intraocular glucocorticoids are taking an increasing place in the therapeutic arsenal for retinal diseases, specific attention should be paid to potential retinal vessels atrophy.

Introduction

Glucocorticoids hormones cross membranes easily due to their lipophilicity and exert physiological effects in almost every tissue of the human body [1-2]. Synthetic or semi-synthetic glucocorticoids (GCs) produced to optimize the immunosuppressive, angiostatic and anti-inflammatory properties of cortisol whilst reducing its mineralocorticoid side effects have become the first-line therapy in number of inflammatory conditions using either systemic or local delivery [3-4]. Amongst the widely recognized side effects of GCs microvascular weakness and/ or atrophy as well as reduced microvascular density in skin, bone and muscle has been well documented [5-7].

Folkman and al. demonstrated that millimolar concentrations of hydrocortisone and dexamethasone prevented heparin-stimulated angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane and induced the regression of capillaries within the surrounding tissue [8-9]. Later, Small et al. showed that corticosterone (300–600nM) could inhibit angiogenesis in vitro and in vivo. In addition, preventing local production of glucocorticoids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enhances angiogenesis providing evidence for the angiostatic role of endogenous corticosteroids [10]. More recently, the mechanisms of the angiostatic effects of physiologic doses of the endogenous corticosterone have been studied in more details revealing a receptor-mediated effect on VEGF production, the activation of MMP2 proteases and the inhibition of endothelial cells tube-like structure formation.[11][4]. Whether higher doses of corticosteroids could exert other types of direct effects on established vessels has been poorly explored. Actually, it was described that systemic administration of GCs triggered cell death of macrophages [12], human epithelial cells of the lens [13], pericytes[14], as well as a necrosis of microvessels and osteocytes of the co-femoral articulation and bruises[15-16].

In ophthalmology, GCs are commonly used not only for the treatment of ocular inflammation but also to manage macular edema of inflammatory or non-inflammatory origins such as diabetic retinopathy or retinal vein occlusion. Because chronic use is required, high doses of the hydrophobic TA or polymeric implants releasing Dexamethasone for sustained periods are used in order to reduce frequency of intraocular administrations [17]. GCs exert quick and striking effects on retinal edema [18] but are associated with potential side effects on the posterior segment of the eye; A reduction of the choroidal vascular network, a decrease of the retinal vessels diameter in rats [9] and a decrease of the retinal vascular density in the developing retinal vasculature have been recorded [19-20]. Whether these vascular effects contribute to the efficiency on the short term treatment is unknown. Moreover if GCs can directly affect endothelial cell viability has not been fully explored.

On the one hand, as compared to bone, muscle or skin vasculature that is constantly remodeled, retinal endothelial cells proliferate at a very slow rate in normal conditions [21-22]. On the other hand, glucocorticoids failed to demonstrate anti-angiogenic effects in retinal or choroidal neovascularisation [23] [24] suggesting that glucocorticoid may exert different effects on endothelial cells from different tissue origin. We have previously shown that clinical doses of intraocular triamcinolone acetonide (TA) induced a non-caspase dependent apoptosis associated with the absence of TUNEL labelling on bovine retinal endothelial cells in culture and neovessels [9][5]. This suggested that non classical mechanism of cell death like autophagy, caspase independent apoptosis or necrosis [25] could be involved in this toxicity.

Taken together, all these results suggest that the molecular mechanisms underlying GCs effects on the vasculature are complex and involve different cellular and molecular pathways depending on the endothelial cell type, the GC dose and duration of exposure.

The aim of this study was to compare the potential toxicity of commonly used GCs on vascular endothelial cells of different origin and to investigate the underlying mechanisms of toxicity for the different GCs. This is a very important point since the evaluation of toxicity relies frequently in caspase-dependent markers and could be underestimated if other molecular mechanisms are involved. The relevance of our *in vitro* findings was assessed by analyzing GCs effects on rat retinal explants.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult males Lewis rats (6-8 weeks old, Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) were used for the ex-vivo experiments. Rats were sacrificed by carbon dioxide inhalation. All experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive 86/609/EEC and approved by local ethical committees of University Paris Descartes.

HMEC Culture

All culture media and additives were purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France)

All Glucocorticoids were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier France).

"Human dermal microvascular endothelial cells" (HMEC) is a transformed cell line which has been transfected with a PBR-322 plasmid containing a region encoding for the SV40 (Simian Virus) gene [26]. Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. They were cultivated in the Endothelial Basal Medium supplemented with L-Glutamine and HEPES 15 mM, 10 % de complemented-free Fetal Calf serum (DFCS) and 1% of streptomycin (100 µg/ml) – penicillin (100 units/ml). Confluent HMEC cells were treated with DL₅₀ GCs: 0.1 mg for hydrocortisone (Hydro), Dexamethasone (Dexa),

Triamcinolone Acetonide (TA) and 1mg for Dexamethasone-Phosphate (Dexa-Ph) in media supplemented with 2% of DFCS for 24 hrs. The Hydrophobic Glucocorticoids (all except for Dexamethasone-Phosphate) were previously dissolved in ethanol-100% then in the medium (ethanol final concentration 1%).

BREC Culture

"Bovine Retinal Endothelial cells"(BRECs) were isolated from the Bovine retinal microvascularization as previously reported [27]. BREC were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with GlutaMAX, 4.5g / L Glucose, 10 % DFCS, 1 % streptomycin(100µg/ml)–(100 Unites/ml)penicillin, 0.5 % Fungizone-Amphotericine and 20 ng/mL VEGF. Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Confluent BRECs cells were treated with DL₅₀ GCs: 0.5 mg for Hydrocortisone, 0.3mg Dexamethasone, 0.2mg Triamcinolone Acetonide and 1mg for Dexamethasone-Phosphate in media supplemented with 2% decompemented fetal calf serum (DFCS) for 24 hrs. The Hydrophobic Glucocorticoids (all except for Dexamethasone-Phosphate) were previously dissolved ethanol-100% then in the medium (ethanol final concentration 1%).

Rat Retinal Explants

After enucleation, rat retinas were isolated immediately under aseptic conditions. They were flattened by 4 orthogonal incisions, then transferred onto a Cyclopore 0.2 µm polycarbonate membrane (Whatman, Maidstone, England), and mounted with the vitreal side up. The support membranes were placed in 6-well tissue culture plates containing 2 ml DMEM supplemented with 10% steroid-free FCS, 1% penicillin-streptomycin and 0.1% Amphotericin-B. Explants were treated with DL₅₀ of BREC cells as described for BREC cultured cells.

MTT ASSAY

The MTT assay is a colorimetric test that was developed to determine the survival and growth of eucaryotic cells in proliferation or to evaluate cytotoxicity [28]. The ability to reduce the Tetrazolium salts by HMEC and BREC cells was used to evaluate the toxicity and DL50 of GCs. Briefly; cells were seeded in 24-multiwell plates at a density of 5×10^4 cells in 1ml of complete medium. Confluent cells were treated during 24 hrs with increasing concentrations of CGs: 0.1mg/ml to 1mg/ml of Hydro, Dexamethasone, Dexamethasone-Phenol and TA. At the end of the treatment, 250 μ l of Cell Titer 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT; Promega, G4000) (5 mg of MTT per ml of phosphate-buffered saline) were added to each well, including six wells that contained only medium or medium containing 1% ethanol (controls). Plates were then incubated for 1 h at 37°C in the dark and analyzed with a microplate reader (BioRad Benchmark, Paris, France) at 570 vs 630nm. Experiments were performed in triplicate and repeated three times.

Internucleosomal DNA degradation

Internucleosomal DNA degradation assay was performed as already described by Zhua and al [29]. Briefly, cells from each condition were obtained by scraping in culture medium. A cell pellet was obtained by centrifugation at 173g, then the pellet was extracted in 30 μ l of Sarkozyl (60 μ l of 50mM of Tris, 10mM of EDTA, 2% of N-Lauryl sarcosine at 7.5pH) and immediately stored on ice. The cellular lysates were then treated for 2 hrs with 1 μ l of proteinase K 20 mg/ml at 45°C and 1 μ l of RNase-A 10 mg/ml for 1hr at 37°C. Finally, the DNA samples were run in a 2% agarose gel and visualized by staining with ethidium bromide.

Lactate dehydrogenase (LDH) Assay

LDH is a cytoplasmic enzyme not released during active cell death like apoptosis, paraptosis, or autophagy, but released in necrosis due to the early increase of plasma membrane permeabilization. The LDH assay was performed according to the manufacturer's instructions in the LDH Cytotoxicity Detection Kit (Roche Applied Sciences). Following GCs treatment, an aliquot of culture supernatant was immediately stored on ice. Cells incubated with 1% Triton-100 represented the positive control (100% of LDH release). The enzymatic reaction was initiated by the addition of 100 μ l of reaction mixture (provided in the Kit) with 100 μ l of supernatant during 30min at room temperature. Reaction products were assessed spectrometrically at an absorbance of 490nm versus 630 nm in 96 multi-well plates. The percentage of cell cytotoxicity was calculated using the following formula: $100 \times [(\text{experimental LDH release}) / (\text{maximum LDH release})]$. The maximum of LDH release corresponding to the amount of LDH released by a total lysis of the cells with Triton-100.

Indirect Immunofluorescence experiments

Cells were seeded at density of $5 \cdot 10^4$ cells in 1ml of complete medium in Lab-Tek devices (4wells, Glass slide). Confluent cells were treated with DL_{50} of GCs at the indicated concentrations according with the cellular origin. The following proteins were tested: Light Chain 3 (LC3), cleaved Caspase-3, Apoptosis Inducing Factor (AIF) and Leukocyte Elastase Inhibitor (LEI/L-DNase II). At the end of the treatment, cells were washed three times with PBS (Phosphate Buffer Saline), fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature, washed three times in PBS, permeabilized with 0.3% de Triton-100 for 15 min, washed three times with PBS for 5 min and then saturated with 1% BSA (Bovine Serum Albumin) in PBS for 1hr. Slides were then incubated with the polyclonal antibody against LC3 (Santa Cruz Biotechnology, sc-16756) and monoclonal antibody against AIF

(EPITOMICS, ab32516) diluted 1:100 in PBS-0.1% BSA, overnight at 4°C, washed five times with PBS, incubated with the secondary antibody. For labeling of LC3 and AIF: anti-LC3 (Invitrogen, A11055, Alexa Fluor® anti-goat) and AIF (Invitrogen, A10040, Alexa Fluor® anti-rabbit) were diluted 1:200 in PBS and incubated for 1 h at room temperature in a humidified chamber. Cells were then washed three times with PBS in the dark and finally mounted with Fluoromount (Sigma Life sciences). For LEI/L-DNase II Cells labeling was performed as described before[30]. For cleaved Caspase-3 labeling, after fixation and permeabilization performed as above, cells were washed three times with PBS and then saturated with 1% skim milk in PBS for 1 hr. Cells were then incubated with monoclonal antibody against caspases-3 (Cell Signaling, 9661S) diluted 1:100 in 0.1% skim milk PBS, overnight at 4°C, washed five times for 5 min with PBS, incubated with the secondary antibody (Invitrogen, A10040, Alexa Fluor® anti-rabbit) diluted 1:200 in PBS, for 1 h at room temperature in a humidified chamber. Cells were then washed three times with PBS in the dark and finally mounted with Fluoromount (Sigma Life Sciences). Cells were observed using a fluorescence microscope Olympus BX51, equipped with a 40x objective. Adobe Photoshop was used as elaborating software.

Cytoplasm and nucleus fractions

Cells were collected by trypsinization and rinsed twice in PBS, then, $2 \cdot 10^6$ cells were resuspended in 500 μ l of a hypotonic solution of $MgCl_2$ (1.5 mM) during 10 min. Cells were then crushed with a Dounce potter and centrifuged 10 min at 390 g. The cytoplasmic fraction contained in the supernatant was removed and the nuclear fraction was resuspended in 1 mL of $MgCl_2$ (1.5 mM) and centrifuged during 10 min at 390 g twice, then resuspended in 200 μ l of 10 mM Tris, 60 mM NaCl, 200 mM sucrose pH 7.4.

To measure the concentration of proteins in both cellular fractions, 10 μ l of the cytoplasmic and nuclear fractions are mixed to 250 μ l of reactive solution (Pierce® BCA Protein Assay Kit,

23225) in a 96 multiwells plate. The plate was incubated 30 min at 37°C then the optical density was read in BioRad Benchmark plate reader. The obtained measures were correlated to a standard curve of BSA made in duplicate (0 to 1200 µg / µl). The sample concentration was calculated by linear regression.

Western blot analysis

Cells were disrupted in RIPA buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton-100, 1% Desoxycholate de sodium, 1% Sodium Dodecyl Sulfate) or M-PER buffer (Thermo Scientific, 78503) in the presence of protease and phosphatase inhibitors. The protein concentration was determined by the BCA method (as previously described). The Proteins were distorted in Laemmli (62 mM Tris-HCl 6.8 pH, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.01% Bromophenol blue). Equal amounts of protein (20 µg) were separated on a 12% Tris-Glycine gel. Nitrocellulose membrane transfer was performed at 100 V for 1:30 h at 4°C and monitored by the membrane staining with Ponceau Red (Sigma-Aldrich). The membrane was saturated with 5% skim milk in PBS for 1 h at room temperature then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies against caspase-3 (1:1000) (Santa Cruz, 1224), cleaved caspase-3 (1:1000) (Cell Signaling, 9661), AIF (1:1000) (Santa Cruz, 9416), LEI/L-DNase II (1:1000) [31], β-Actin (1:1000) (Santa Cruz, 1616). After 5 washes in PBS containing 0.1% Tween-20, the membrane was incubated for 1 hr with the anti-rabbit (Victor Laboratories, PI-1000) or anti-Goat (Victor Laboratories, PI-9500) secondary antibodies conjugated to peroxidase, diluted 1:5000, in PBS containing 0.5% Skim Milk and then washed 5 times in PBS. PARP western blot was performed as already described by Blenn and al [32]. Visualization of the immunoreactive bands was obtained by a chemoluminescent substrate, SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo scientific, 34087).

Retinal Flat Mounting

After GCs treatment, retinas were immediately washed and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min. They were then permeabilized with PBS containing 0.1% Triton X-100, and incubated with the rabbit anti-caspase-3 and mouse anti-von Willebrand antibody or the chicken anti-LEI and rabbit anti- anti-von Willebrand (1:100) overnight at 4°C. After washing 5 times with PBS, retinas were incubated with the secondary antibody (Alexa Fluor® 405-conjugated goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor® 594-conjugated Donkey anti-mouse IgG or Alexa Fluor® 568-conjugated goat anti-chicken IgG and Alexa Fluor® 405-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200)) for 1 hr. For phosphatase treatment, retinas were incubated for 30 min at 37°C with calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP, Invitrogen, 8009-019) in dephosphorylation buffer (Invitrogen, P/N 01371) then washed 3 times. The dephosphorylation has as objective to unmask OH DNA extremity stemming from activation of caspases independent cell death. Finally, Retinas were fixed with 4%paraformaldehyde then incubated for 1 hr with 80 µl of terminaldeoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling assay (TUNEL; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) reaction mixture at 37 °C. The retinas were flat mounted using Fluor mount. Images were taken using a confocal laser scanning microscope Zeiss LSM 710 (Oberkochen, Germany).

Statistics

Data were expressed as means ± SE. Statistical analysis was made using the Graphpad Prism5 program (Graphpad Software, San Diego, CA, USA). Mann-Whitney test comparison was used. P < 0.05 deemed significant.

Results

Dose-dependent Effect of Glucocorticoids (GCs) on Microvascular endothelial cells viability (HMEC, BREC) and lethal doses (DL₅₀) determination:

In order to evaluate the sensitivity of HMEC and BREC to corticosteroids, cells were treated at different concentration [0.1 mg/ml - 1mg/ml] of Hydrocortisone (Hydro), Triamcinolone Acètonide (TA), Dexamathasone (Dexa) and Dexamethasone Phosphate (Dexa-Ph) for 24h. Because hydrophobic glucocorticoids form dense and adherent toxic aggregates when directly added to culture medium [33], glucocorticoids (Hydro, TA, Dexa) were first dissolved in Ethanol 100%, then in the culture medium. The reduced viability measured by the MTT assay was correlated to a reduced number of living cells as verified by the trypan blue assay (not shown). Figure 1 shows that GCs exert different dose –dependent reduction of cell viability depending on the molecule and the cell type. Hydrocortisone was the less toxic and HMEC were more sensitive than BREC cells. In order to have comparative results, in the following experiments each cell type was treated with definite glucocorticoids doses corresponding to the calculated DL₅₀.

The mechanisms of cell death induced by GCs:

In order to analyze the mechanisms underlying GC toxicity on endothelial cells, we successively evaluated markers for autophagy, necrosis, and caspase-dependent and caspase-independent apoptosis. These analyses were performed on HMEC using for each steroid its DL₅₀ dose as determined above.

Autophagy

The presence of autophagy was analyzed using an antibody against MAP-LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*). This protein is integrated to the autophagosomes

membranes[34].In physiological conditions, the quiescent LC3 has a diffuse distribution in the cytoplasm. Once the autophagy activates, LC3 concentrates in the autophagosome membrane and gives a punctuate labeling as observed in cells cultured in a depleted amino-acids medium. No such labeling was observed with GCs treatment eliminating autophagy as a potential mechanism(Figure 2A).

DNA damage and necrosis.

The DNA fragmentation into oligonucleosomal fragments is a widely recognized hallmark of apoptotic cell death, as induced by HMA used as a positive control. The “DNA ladder” pattern was clearly seen in samples treated with Dexa and Dexa-Ph, faintly with TA treatment and not at all in Hydro treated cells (Figure 2 B). In order to evaluate if necrosis participate to this process of cell death, the release of LDH was investigated. Amongst the GCs tested at their respective DL₅₀ doses, only Dexa (0.1 mg/ml) induced a significant increase of LDH release (31.17%; **P≤0.01) as compared to control untreated cells (Figure 2C).

Caspase-dependent apoptosis in GCs toxicity

Caspase 3 activation was analyzed by immunocytochemistry (Figure 3A) and western blot (Figure 3B). Amongst the GCs tested at their respective DL50 doses, only Dexa and Dexa-Ph induced activation of caspase 3 as observed on immunohistochemistry (figure 3A) and its activation by cleavage on western blot (Figure 3 B). Moreover, PARP, one of the main targets of activated Caspase-3 was cleaved in cells treated with Dexa and Dexa-Ph but not in cells treated with other CGs (Figure 3B). In all these experiments the treatment of cells with etoposide, an inhibitor of topoisomerase I, knowing to induce caspase dependent cell death is used as a positive control.

Caspase-independent apoptosis in GCs toxicity.

Due to the lack of caspase activation in TA and Hydro, we analyzed caspase independent pathways, namely Apoptosis Inducing Factor (AIF) and Leukocyte Elastase Inhibitor (LEI/LDNase II).

LEI (Leukocyte Elastase Inhibitor) is a cytoplasmic molecule owning an anti-protease activity. After induction of apoptosis it is cleaved and transformed into L-DNase II, a molecule that has an endonuclease activity and that is translocated to the nucleus[35].

The activation of L-DNase II was estimated by immunostaining and Western blot. L-DNaseII activation and nuclear translocation were observed with all GCs (clearly showed on both higher magnifications corresponding to cells treated with hydrocortisone and Dexamethasone) (Figure 4A). In order to verify the nuclear translocation of this protein we fractionated cytoplasm from nuclei, and performed a western blot on both fractions (Figure 4 B). We observed the presence of native LEI (42KDa) in the cytoplasmic fractions while the nuclear fractions contained, in addition, one band of 35kDa which corresponds to the active L-DNase II[36]. Taken together these results indicate that GCs activate the LEI/L-DNase II pathway.

Concerning AIF, (Figure 5) HMEC cells treated with the GCs presented a cytoplasmic dotted labeling which was compatible with its classical mitochondrial localization. This localization did not seem modified with the GCs (Figure 5 A). As previously done, we verified this result by blot western (Figure 5B). Given that the important point of the activation of this way is the mitochondrial release and nuclear translocation, we performed a fractionation of the cytoplasm from nuclei. No nuclear AIF was found in HMEC cells after GCs treatment, but was found in the staurosporine treated cells used as a positive control. These results indicate that the AIF effector is not activated by GCs in HMEC cells.

Effect of Glucocorticoids on BREC.

To verify if the cellular phenomena induced by the GCs on the HMEC were reproducible on retina endothelial cells, we analyzed the activation of cell death pathways previously studied on BREC.

For this purpose, BREC were treated for 24 h with DL₅₀ (Table: 1), then the activation of Caspas-3, LEI/L-DNaseII and AIF was estimated by immunostaining with corresponding antibody. The activation of Caspase-3 was observed on BREC treated with Dexa and Dexa-Ph, as already indicated on HMEC. Hydro and TA did not induce the caspase dependent cell death (Figure 6 A). In same manner, the activation of the LEI and nuclear translocation of L-DNaseII were observed with all GCs on BREC (As showed in higher magnifications corresponding to the framed areas of cells treated with hydro and Dexa-Ph) (Figure 6 B).

The analysis of immunocytochemistry of AIF on BREC showed a cytoplasmic dotted labeling indicating the mitochondrial localization of AIF with all GCs treatment, while cells treated with the staurosporine (positive control) reveal a diffuse immunolabeling in the cytoplasm and a nuclear translocation (Figure 6 C).

Impact of GCs on the retinal microvasculature

The *in vitro* experiments described above showed the toxic effects of GCs on HMEC and BREC. In order to be near the physiological conditions where the endothelial cells are organized as microvascular networks, rat retina explants were treated with GCs at the DL₅₀ determined for BREC cells (Table:1) for 24 h. The retinal microvasculature was immunostained with anti-Von Willebrand antibody. The double immunolabeling anti-caspase with Tunel positive or anti-LEI/L-DNaseII with Tunel+Phosphatase positive allowed us to analyze the activation of these cell death pathways. As for HMEC and BREC, the activation

of Caspase-3 was observed on retina microvasculature treated with Dexa and Dexa-Ph, Hydro and TA did not induce a caspase-dependent cell death (Figure7 A). Also LEI/L-DNaseII was activated on retina microvascular cells with all tested GCs as observed in our *in vitro* experiments (Figure7 B).

Discussion

Intraocular glucocorticoids are widely used to treat retinal diseases, directly injected into the vitreous as non-soluble crystal suspension (like triamcinolone acetonide) or more recently as polymeric PLGA implants releasing dexamethasone. The choice of the glucocorticoid is empirical since very few studies have compared their potential toxic and beneficial effects. In this study, we have focused on the potential toxicity of GC on the microvasculature. We have compared two cell lines of dermal and retinal origin and have then evaluated in detail the mechanisms of different GCs toxicity. Our result show that endothelial cells from retinal origin (BREC) are less sensitive to all GCs tested as compared to endothelial cells for dermal origin (HMEC). In the eye, cortisol levels are higher than in the circulation and no CBG is present, explaining in part the immunologic privilege of the intraocular media [37]. This could explain that endothelial cells from retina are more resistant to steroid-induced toxicity. Moreover, depending on their dose and relative affinity for gluco or mineralocorticoid receptors, glucocorticoids can exert beneficial or deleterious effects on vascular permeability through junction, adhesion and cytoskeleton remodeling [38]. MR activation was recently shown to enhance HMEC cells permeability [39].

In the retina, vessels renewing is extremely low as compared to proliferative tissue like the skin, explaining that retinal endothelial cells could be more resistant to stress than endothelial cells from skin origin [21-22].

Although the tested drugs belong to the same pharmacological family, they showed a different cellular toxicity. Our results show that the more hydrophilic GCs, the Dexamethasone phosphate (Dexa-Ph) and the hydrocortisone (Hydro) were less toxic compared to the more lipophilic, Dexamethasone (Dexa) and Triamcinolone Acètonide (TA). This difference can be explained, on one hand, by the fact that the hydrophilic GCs cannot cross easily the intact membranes; they are thus less bioavailable in cells and less toxic. On the other hand, the most lipophilic GCs formed crystals which cause a mechanical stress that accentuated their toxicity[40].

TA is the most administered GC in the eye, mainly under a formulation not adapted to ophthalmology, because it was originally designed for the intramuscular and intra-articular administration. Studies on the toxicity of TA and/or its excipient (benzylalcohol), the crystalline or soluble formulations led to the divergent and not decisive results[5,41].

Indeed, no toxicity of TA or of the excipient was revealed in some studies [42-43] while other works clearly established the toxicity of TA and/or the excipient in the eye, with a disorganization of the retina layers, a loss of the choroid network density and a vasoconstriction of the retina blood vessels [5,19,44].

TA showed dose and time dependent cytotoxicity on retinal pigment epithelium cells, glial cells and endothelial cells of the retina. This toxicity triggered a reduction in mitochondrial activity, and an activation of caspase-independent cell death mechanism (paraptosis in EPR cells, LEI-LDNase II and AIF in retinal endothelial cells [43], [41,45]). This explains the

results obtained by some authors that reported no caspase activation after 24 hrs of treatment with TA on primary human retinal microvascular and flat mounted rat retinas [20], demonstrating that the assessment of cell death pathways is a basic step to estimate the safety or the toxicity of health product. We show here that different cell death mechanisms other than classical caspase dependent apoptosis are responsible for cell death induced by GC and that the same mechanisms seen in cell culture were also seen *ex-vivo* (microvessels of retina).

In this study the toxicity of several GCs was estimated and compared for the first time, on microvascular endothelial cells of various tissue origins. This toxicity was often rejected because the tests used were not suitable for determining caspase-independent cell death. More disturbing, doses used on our experiments, that proved to be cytotoxic, were lower than those used clinically.

Our work highlights the potential underestimated hazard of the use of high and/or prolonged GC doses on the integrity of the microcirculation and the organs they supply. However, these compounds have interesting clinical applications. Work should be done to establish the safety concentrations to be used according to the pathology to be treated.

References

- [1] Walker, J.J., Spiga, F., Waite, E., Zhao, Z., Kershaw, Y., Terry, J.R. and Lightman, S.L. (2012). The origin of glucocorticoid hormone oscillations. *PLoS Biol* 10, e1001341.
- [2] JF., C. (2013). Individual variation in glucocorticoid stress responses in animals. *General and Comparative Endocrinology* 147, 45–58.
- [3] Barnes, P.J. (2005). Molecular mechanisms and cellular effects of glucocorticosteroids. *Immunol Allergy Clin North Am* 25, 451-68.
- [4] James J. Logie, S.A., Kathryn M. Marshall, Margarete M. S. Heck, Brian R. Walker, Patrick W. F. Hadoke. (2010). Glucocorticoid-Mediated Inhibition of Angiogenic Changes in Human Endothelial Cells Is Not Caused by Reductions in Cell Proliferation or Migration *Public Library of Science* Volume 5, e14476.

- [5] Torriglia, A., Valamanesh, F. and Behar-Cohen, F. (2010). On the retinal toxicity of intraocular glucocorticoids. *Biochem Pharmacol* 80, 1878-86.
- [6] Anacker, C., Zunszain, P.A., Carvalho, L.A. and Pariante, C.M. (2011). The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology* 36, 415-25.
- [7] Schacke, H., Docke, W.D. and Asadullah, K. (2002). Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 96, 23-43.
- [8] Folkman, J. and Ingber, D.E. (1987). Angiostatic steroids. Method of discovery and mechanism of action. *Ann Surg* 206, 374-83.
- [9] Folkman, J., Langer, R., Linhardt, R.J., Haudenschild, C. and Taylor, S. (1983). Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* 221, 719-25.
- [10] Small, G.R., Hadoke, P.W., Sharif, I., Dover, A.R., Armour, D., Kenyon, C.J., Gray, G.A. and Walker, B.R. (2005). Preventing local regeneration of glucocorticoids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enhances angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12165-70.
- [11] Shikatani, E.A. et al. (2012). Inhibition of proliferation, migration and proteolysis contribute to corticosterone-mediated inhibition of angiogenesis. *PLoS One* 7, e46625.
- [12] Schmidt, M., Pauels, H.G., Luger, N., Luger, A., Domschke, W. and Kucharzik, T. (1999). Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: potential role of IL-1 beta. *J Immunol* 163, 3484-90.
- [13] Sharma, A., Pirouzmanesh, A., Patil, J., Estrago-Franco, M.F., Zacharias, L.C., Andley, U.P., Kenney, M.C. and Kuppermann, B.D. (2011). Evaluation of the toxicity of triamcinolone acetonide and dexamethasone sodium phosphate on human lens epithelial cells (HLE B-3). *J Ocul Pharmacol Ther* 27, 265-71.
- [14] Katychev, A., Wang, X., Duffy, A. and Dore-Duffy, P. (2003). Glucocorticoid-induced apoptosis in CNS microvascular pericytes. *Dev Neurosci* 25, 436-46.
- [15] Allen, D.B., Bielory, L., Derendorf, H., Dluhy, R., Colice, G.L. and Szeffler, S.J. (2003). Inhaled corticosteroids: past lessons and future issues. *J Allergy Clin Immunol* 112, S1-40.
- [16] Hu, Z.M., Wang, H.B., Zhou, M.Q., Yao, X.S., Ma, L. and Wang, X.N. (2006). [Pathological changes of the blood vessels in rabbit femoral head with glucocorticoid-induced necrosis]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 26, 785-7.
- [17] Behar-Cohen, F. (2011). [Retinal drug targets]. *Ann Pharm Fr* 69, 124-30.
- [18] Miyamoto, N., Iossifov, D., Metge, F. and Behar-Cohen, F. (2006). Early effects of intravitreal triamcinolone on macular edema: mechanistic implication. *Ophthalmology* 113, 2048-53.
- [19] Valamanesh, F. et al. (2009). Effects of triamcinolone acetonide on vessels of the posterior segment of the eye. *Mol Vis* 15, 2634-48.
- [20] Hartnett, M.E., Martiniuk, D.J., Saito, Y., Geisen, P., Peterson, L.J. and McColm, J.R. (2006). Triamcinolone reduces neovascularization, capillary density and IGF-1 receptor phosphorylation in a model of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 4975-82.
- [21] Corvol, P. and Postel-Vinay, N. (2008) *L'arbre vasculaire: nouvelles voies de guérison*, Odile Jacob
- [22] Joussen, A.M., Gardner, T.W., Kirchhof, B. and Ryan, S.J. (2007) *Retinal vascular disease*, Springer
- [23] Geltzer, A., Turalba, A. and Vedula, S.S. (2013). Surgical implantation of steroids with antiangiogenic characteristics for treating neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev* 1, CD005022.

- [24] Chan, C.K., Ip, M.S., Vanveldhuisen, P.C., Oden, N.L., Scott, I.U., Tolentino, M.J. and Blodi, B.A. (2011). SCORE Study report #11: incidences of neovascular events in eyes with retinal vein occlusion. *Ophthalmology* 118, 1364-72.
- [25] Galluzzi, L. et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19, 107-20.
- [26] Ades, E.W., Candal, F.J., Swerlick, R.A., George, V.G., Summers, S., Bosse, D.C. and Lawley, T.J. (1992). HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 99, 683-90.
- [27] Capetandes, A. and Gerritsen, M.E. (1990). Simplified methods for consistent and selective culture of bovine retinal endothelial cells and pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31, 1738-44.
- [28] Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- [29] Ning Zhua, Z.W. (1997). An Assay for DNA Fragmentation in Apoptosis without Phenol/Chloroform Extraction and Ethanol Precipitation. *Analytical Biochemistry* Volume 246, Pages 155–158.
- [30] Altairac, S., Zeggai, S., Perani, P., Courtois, Y. and Torriglia, A. (2003). Apoptosis induced by Na⁺/H⁺ antiport inhibition activates the LEI/L-DNase II pathway. *Cell Death Differ* 10, 548-57.
- [31] Torriglia, A., Chaudun, E., Chany-Fournier, F., Jeanny, J.C., Courtois, Y. and Counis, M.F. (1995). Involvement of DNase II in nuclear degeneration during lens cell differentiation. *J Biol Chem* 270, 28579-85.
- [32] Blenn, C., Althaus, F.R. and Malanga, M. (2006). Poly(ADP-ribose) glycohydrolase silencing protects against H₂O₂-induced cell death. *Biochem J* 396, 419-29.
- [33] Szurman, P. et al. (2007). Different biocompatibility of crystalline triamcinolone deposits on retinal cells in vitro and in vivo. *Exp Eye Res* 85, 44-53.
- [34] Tanida, I., Ueno, T. and Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2503-18.
- [35] Padron-Barthe, L., Lepretre, C., Martin, E., Counis, M.F. and Torriglia, A. (2007). Conformational modification of serpins transforms leukocyte elastase inhibitor into an endonuclease involved in apoptosis. *Mol Cell Biol* 27, 4028-36.
- [36] Belmokhtar, C.A., Torriglia, A., Counis, M.F., Courtois, Y., Jacquemin-Sablon, A. and Segal-Bendirdjian, E. (2000). Nuclear translocation of a leukocyte elastase Inhibitor/Elastase complex during staurosporine-induced apoptosis: role in the generation of nuclear L-DNase II activity. *Exp Cell Res* 254, 99-109.
- [37] Denniston, A.K. et al. (2011). Endogenous cortisol and TGF-beta in human aqueous humor contribute to ocular immune privilege by regulating dendritic cell function. *J Immunol* 186, 305-11.
- [38] Chen, W., Lee, J.Y. and Hsieh, W.C. (2002). Effects of dexamethasone and sex hormones on cytokine-induced cellular adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Eur J Dermatol* 12, 445-8.
- [39] Kirsch, T., Beese, M., Wyss, K., Klinge, U., Haller, H., Haubitz, M. and Fiebeler, A. (2013). Aldosterone modulates endothelial permeability and endothelial nitric oxide synthase activity by rearrangement of the actin cytoskeleton. *Hypertension* 61, 501-8.
- [40] Luke, M. et al. (2008). The effects of triamcinolone crystals on retinal function in a model of isolated perfused vertebrate retina. *Exp Eye Res* 87, 22-9.
- [41] Valamanesh, F., Torriglia, A., Savoldelli, M., Gandolphe, C., Jeanny, J.C., BenEzra, D. and Behar-Cohen, F. (2007). Glucocorticoids induce retinal toxicity through mechanisms mainly associated with paraptosis. *Mol Vis* 13, 1746-57.

- [42] McCuen BW 2nd, B.M., Tano Y, Chandler D, Macheimer R. (1981). The lack of toxicity of intravitreally administered triamcinolone acetonide. *Am J Ophthalmol* 91, 785-788.
- [43] Narayanan, R., Mungcal, J.K., Kenney, M.C., Seigel, G.M. and Kuppermann, B.D. (2006). Toxicity of triamcinolone acetonide on retinal neurosensory and pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 722-8.
- [44] Morrison, V.L., Koh, H.J., Cheng, L., Bessho, K., Davidson, M.C. and Freeman, W.R. (2006). Intravitreal toxicity of the kenalog vehicle (benzyl alcohol) in rabbits. *Retina* 26, 339-44.
- [45] Yeung, C.K., Chan, K.P., Chiang, S.W., Pang, C.P. and Lam, D.S. (2003). The toxic and stress responses of cultured human retinal pigment epithelium (ARPE19) and human glial cells (SVG) in the presence of triamcinolone. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 5293-300.

Figures and legends

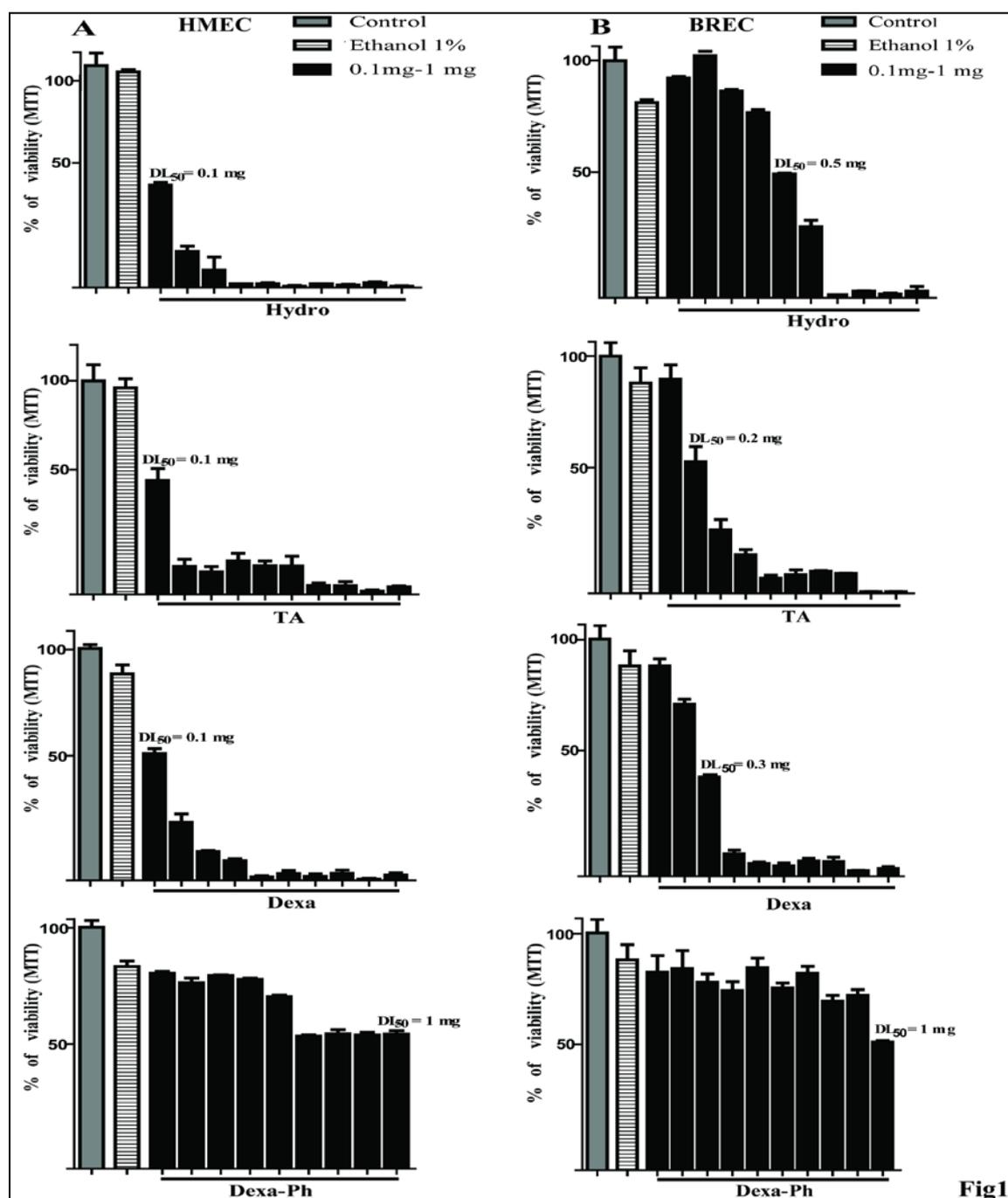


Figure 1: Evaluation of the Toxicity and determination of lethal dose (DL_{50}) of different Glucocorticoids (GCs) on Human endothelial cells (HMEC) or Bovine retinal endothelial cells (BREC). Cells were treated with Hydrocortisone(Hydro), Triamcinolone Acetonid(TA), Dexamethasone(Dexa), Dexamethasone Phosphate(Dexa-Ph) for 24h. The lipophilic Gcs (Hydro, TA, Dexa) were dissolved at fist in Ethanol 100% then in cell culture medium. Control cells were either exposed to 1% ethanol or were left untreated. Cell viability was evaluated using MTT assay.

The lipophilic Gcs Show a dose-reponse relationship between the decline of viability and the increase of the dose while Dexa-Ph shows a considerable toxicity at high doses.

Lethal Dose 50 (DL₅₀) of Glucocorticoids				
	Hydrocortisone	Triamcinolone Acetonide	Dexamethasone	Dexamethasone phosphate
HMEC	0.1mg/ml	0.1mg/ml	0.1mg/ml	1mg/ml
BREC	0.5mg/ml	0.2mg/ml	0.3mg/ml	1mg/ml

Table 1: Summary of GCs doses which induced 50% of celled death (DL₅₀) on HMEC and BREC. The DL₅₀ was determined by MTT test after 24 hrs of treatment with GCs. The DL₅₀ was unlike according to each GC as well as the origin of endothelial cells.

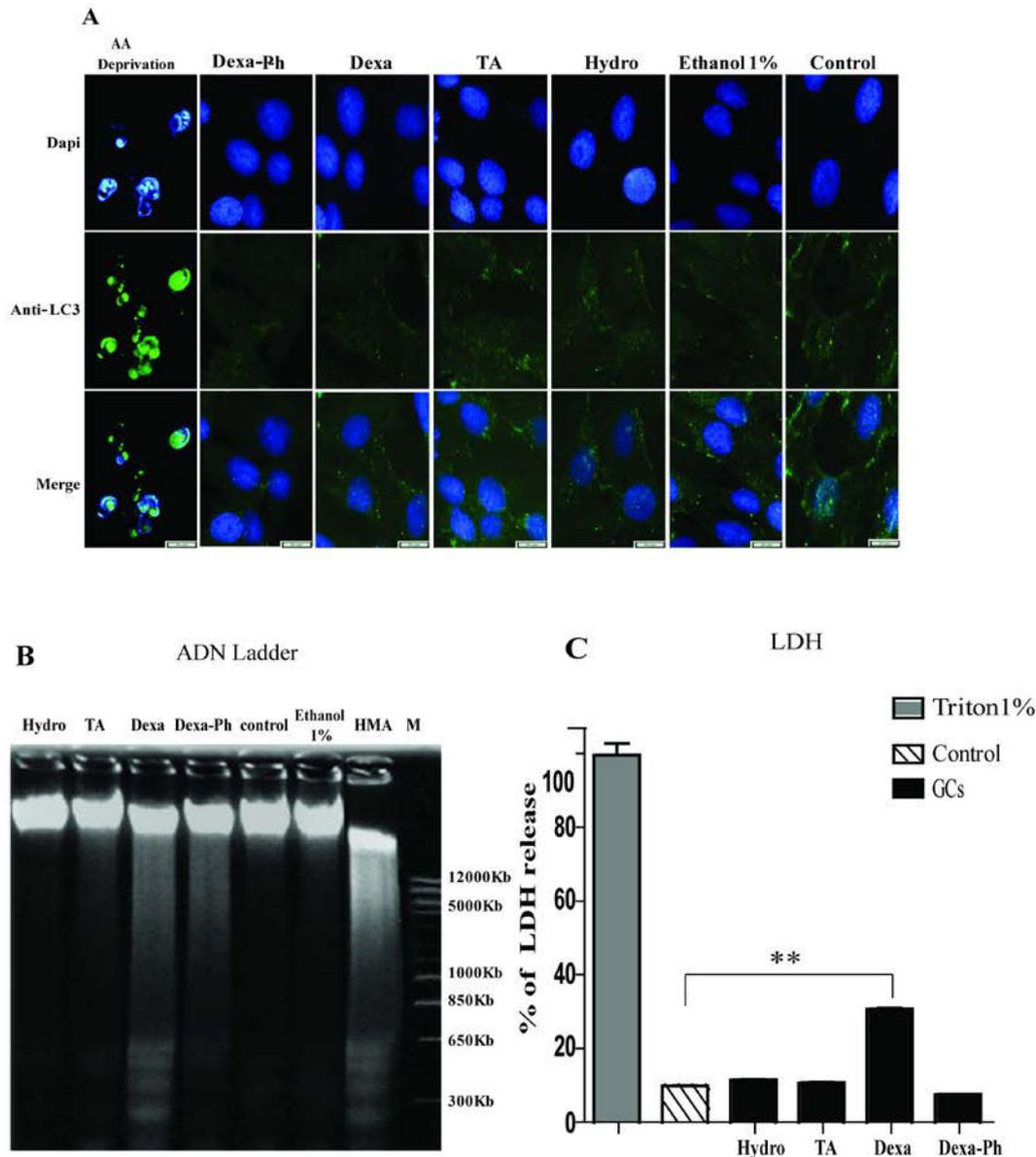


Fig 2

Figure 2: Cell death in GCs treated HMEC cells.(A)The activation of autophagy process was evaluated by anti-LC3 immunocytochemistry. HMEC cells were treated for 24 hours with the DL₅₀ of GCs. For the positive control; cells were incubated with medium lacking amino acids. HMEC cells were fixed, permeabilized and immunostained by anti-LC3, all treatments revealed diffuse cellular labeling of LC3 confirming the absence of autophagy vesicles. Scale bars represent 5µm. (B)Agarose gel (2%) electrophoresis of DNA extracted from HMEC treated with DL₅₀ concentrations of Glucocorticoids revealed oligonucleosomal fragments of DNA. Control: Untreated cells, Ethanol 1%: medium containing 1% of ethanol, treatment with 40µm HMA (5-N, N-hexamethylene-amiloride) was used as a positive control for apoptosis. Dexa, Dexa-Ph and TA induced genomic DNA degradation.(C)The release of lactate dehydrogenase (LDH) from HMEC cells treated 24 h with DL₅₀ of corticoids was measured in the culture medium and compared to the maximal LDH release, determined by exposing the cells to 1% of Triton X-100. Each experiment was performed in triplicate .Data are expressed as medium percentage of lactate dehydrogenase (LDH) released into the media. Dexamethasone induced an increased release of LDH as compared to control and to the other treatments (**P≤0.01).

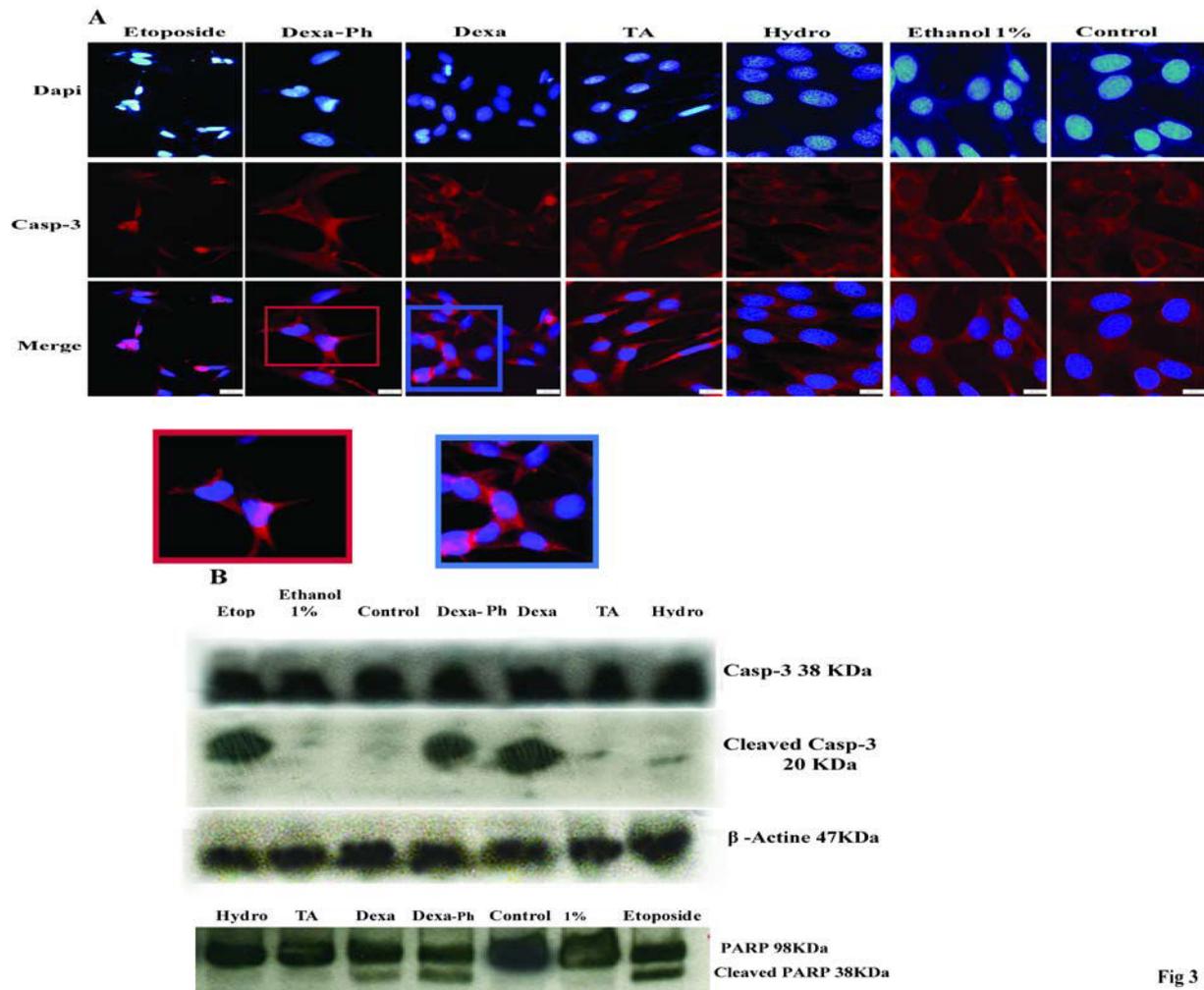


Fig 3

Figure 3: The activation of caspases in GCs treated HMEC cells. A) The activation of Caspase-3 and its perinuclear localization were analyzed by immunolabelling of HMEC cells using a anti-active caspase-3 antibody. The cells were exposed for 24 hours with the DL₅₀ of GCs. Cells incubated with Etoposide were used as positive control. Only Dexa and Dexa-Ph induced an activation of caspase 3. Scale bars represent 7 μ m. B) Caspase 3 and PARP western-blot analysis. Protein extracts from GCs treated HMEC cells were separated in 12% acrylamide gel, transferred to nitrocellulose and revealed with anti-caspase 3. Apoptosis induced in HMECs with Etoposide (50 mM for 24 h) was used as positive control. Activated caspase 3 and cleaved PARP were detected in HMECs treated with Dexamethasone and Dexamethasone-Ph, showing that both GCs induce caspase 3 activation.

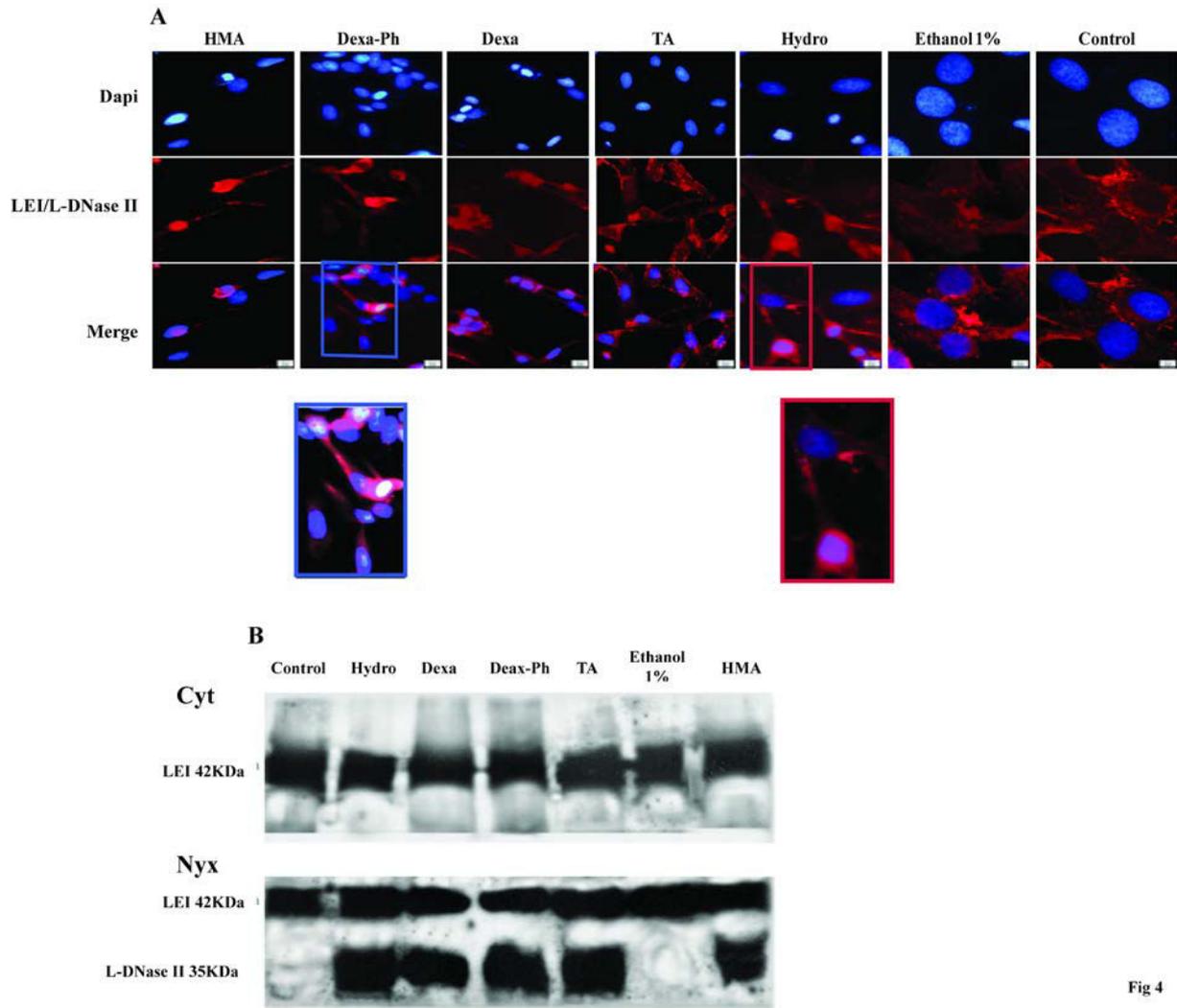


Fig 4

Figure 4: Activation of the L-DNase II pathway in GCs treated HMEC cells. A) HMEC cells were treated with the DL_{50} of GCs for 24 hours and immunostained with an anti-LEI/L-DNase II. HMEC Cells exposed to HMA represent the positive control. All the GCs led to LEI/LDNase II activation with an intense and nuclear staining. Scale bar represents 10 μ m. B) GCs treated HMEC were fractionated into cytoplasmic and nuclear fractions. Western blot analysis using an anti-LEI/L-DNase II revealed an accumulation of L-DNase II in the nucleus of treated cells, a phenomena also seen in HMA treated cells used as a positive control .

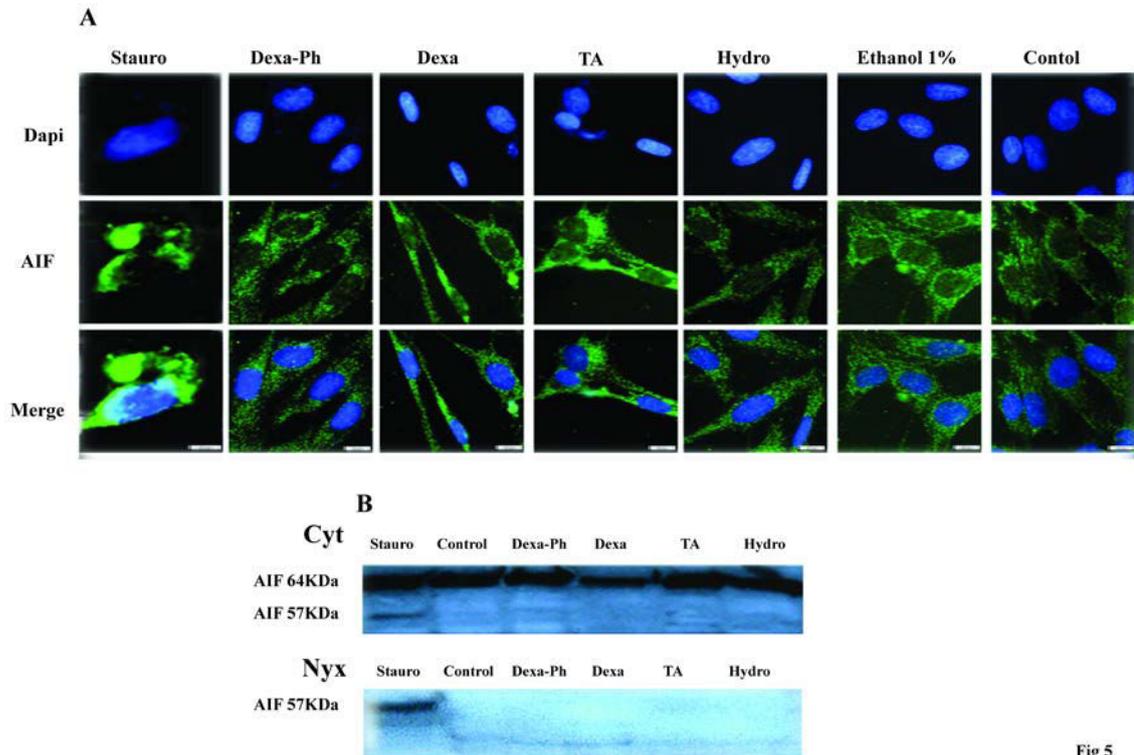


Fig 5

Figure 5: AIF activation in GCs treated HMEC cells. A) Nuclear translocation of AIF was evaluated by anti-AIF immunocytochemistry. HMEC cells were treated for 24 hours with the DL_{50} of GCs, for the positive control; cells were treated with Staurosporine (Stauro). Control cells and GCs treated cells revealed a dotted labelling of AIF, that suggests a mitochondrial localization of AIF. Scale bars represent $10\mu M$ B) AIF western blot was performed on nuclear and cytoplasmic fractions. AIF was present in all nuclear fractions, only the Staurosporine treated cells used as a positive control show a nuclear translocation of AIF.

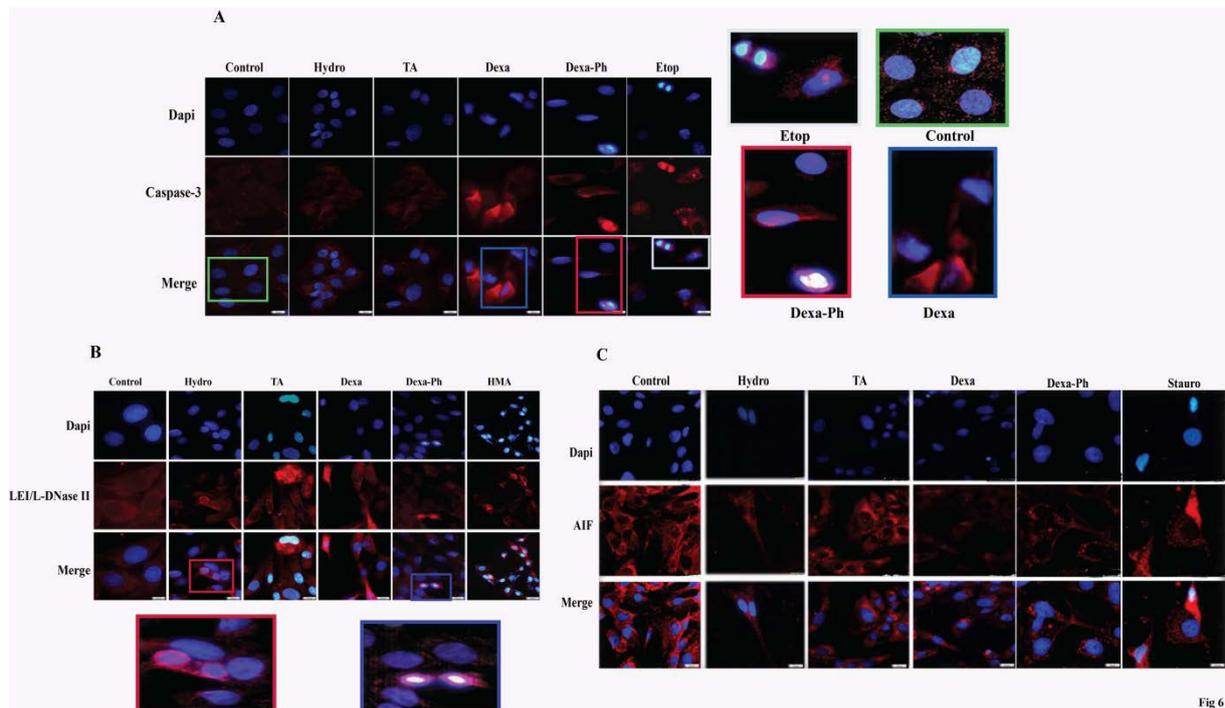


Fig 6

Figure 6: The activation of caspase dependent and independent cell death in GCs treated BREC cells. For all experiments BREC were treated during 24h with DL_{50} of GCs.

A) Activated caspase-3 immunocytochemistry of BREC cells. BREC were immunostained with an antibody that specifically recognizes the cleavedcaspase 3. Etoposide was used as a positive control. Like previously observed with HMEC cells, only Dexa and Dexa-Ph induced an activation of caspase 3. Scale bar $10\mu\text{m}$. B) BREC cells were immunostained with an anti-LEI / L-DNase II. BREC Cells exposed to HMA represent the positive control. All the GCs led to LEI/LDNase II activation with an intense and nuclear staining; the same outcomes were observed previously with HMEC. Scale bar $8\mu\text{m}$. C) Nuclear translocation of AIF in BREC was evaluated by anti-AIF immunocytochemistry. Cells were treated with Staurosporine represent a positive control. GCs treated cells revealed a dotted labelling of AIF, which suggests a mitochondrial localization of AIF. Scale bars represent $10\mu\text{m}$.

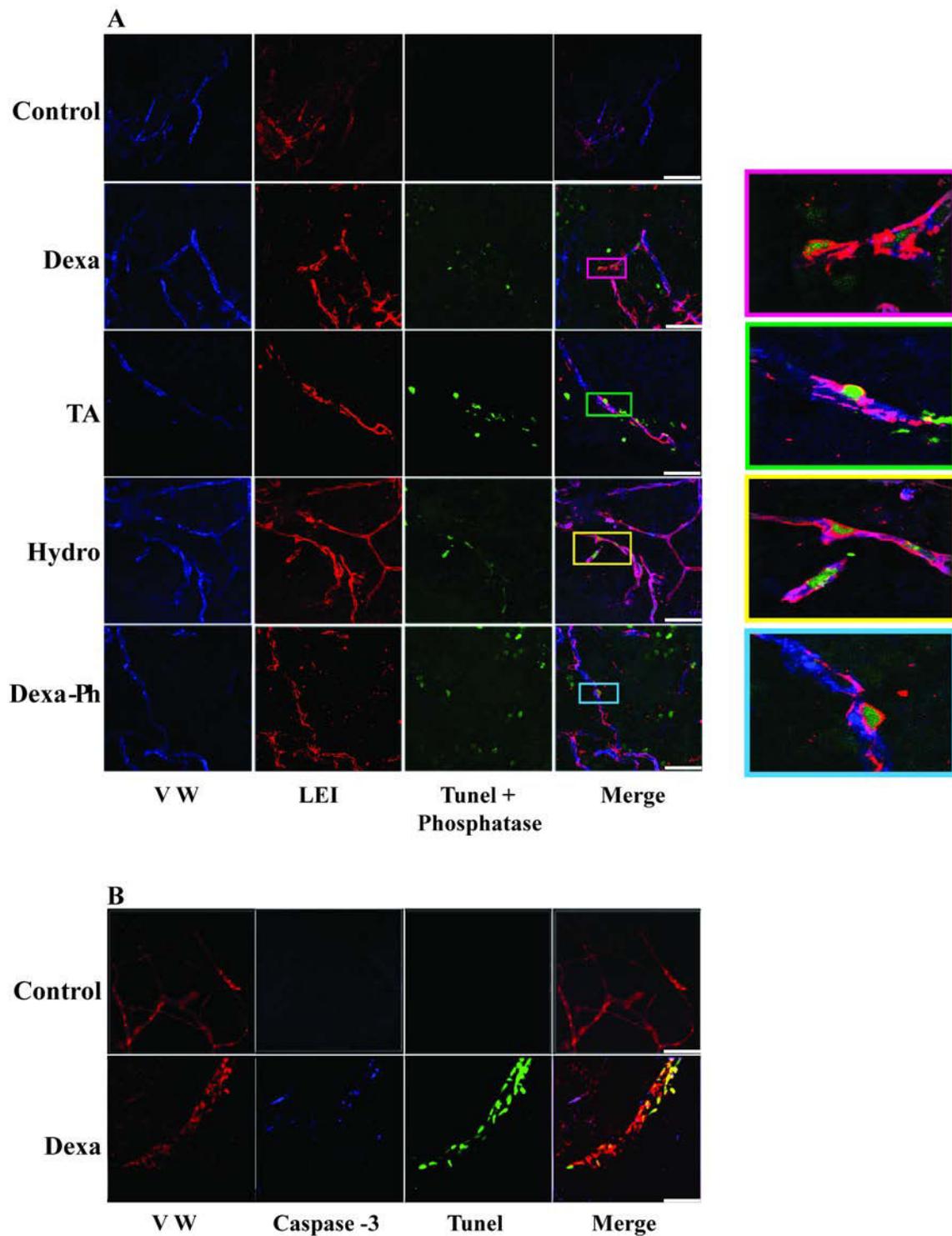


Figure 7: Cell death pathway induced by GCs on retina microvasculature. Retinas from Lewis rats were flat mounted, treated with GC and analyzed. The retinas treated with steroids-free medium were used as control. A) The overlap of colors on merge of retina explant vessels treated for 24h with DL₅₀ of Hydro, TA, Dexa, Dexa-Ph showed that LEI/LDNase II was activated with all treatment. B) As observed previously with *in vitro* experiments, the activation of Caspase on retina vessels was induced only with Dexa and Dexa-Ph. Scale bar represents 30µm.

2 L'implication des récepteurs des GCs dans la toxicité induite par les GCs sur les cellules endothéliales.

Les GCs de synthèse utilisés en clinique et dans notre étude diffèrent des principes naturels par des substitutions de groupements chimiques qui augmentent leurs propriétés glucocorticoïdes anti-inflammatoires tout en diminuant leurs propriétés minéralocorticoïdes.

Les GCs agissent couramment par le biais de récepteurs spécifiques intracellulaires, ubiquitaires, appartenant à la superfamille des récepteurs aux stéroïdes, les récepteurs Glucocorticoïdes (GRs). Les GCs se lient également aux récepteurs minéralocorticoïdes (MRs) mais avec une faible affinité par rapport aux GRs. Dans le cytosol la densité des GRs et MRs est variable selon la cellule. A l'état inactif, ils sont liés à des protéines de choc thermique qui assurent leur stabilité. Une fois liées aux GCs, ils se transloquent dans le noyau et forment des dimères qui; se lient à l'élément de réponse de l'hormone et activent la transcription de gènes cibles des protéines d'intérêt. Cette cascade de signalisation est impliquée dans de nombreuses voies physiologiques mais aussi dans certaines situations pathologiques.

Les effets bénéfiques des GCs sont surtout médiés par la répression de la transcription des gènes impliqués dans le processus pathologique. Par ailleurs, les mécanismes moléculaires de leurs effets colatéraux sont complexes et restent très peu élucidés. Des études récentes ont montré que les mécanismes des effets indésirables varient en fonction des tissus, ils peuvent résulter d'une trans-activation (Diabète et glaucome) et/ou d'une trans-répression (ostéoporose, axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien) de certains gènes *via* le GR (17, 256).

Dans notre étude, nous avons constaté que les GCs utilisés étaient toxiques sur les cellules endothéliales *in vitro* et les microvaisseaux rétiniens chez le rat. Il nous a semblé important de savoir si cette toxicité était médiée ou pas par les récepteurs stéroïdiens.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons évalué la mort cellulaire des HMECs traitées avec les GCs en présence des antagonistes des GRs ou des MRs ou les deux simultanément.

Dans un premier temps, nous avons confirmé par RT-PCR que les HMECs expriment les GRs et MRs. Il est à noter d'emblée que nous n'avons pas étudié les mécanismes moléculaires induits par l'antagonisme GRs et MRs dans nos cellules endothéliales.

2.1 L'évaluation de la mort cellulaire induite par les GCs en présence des antagonistes de leurs cibles intracellulaires.

2.1.1 Technique

L'ensemble des matériels et méthodes employés est détaillé dans l'article précédent.

Nous avons utilisé le test MTT pour évaluer la survie cellulaire.

Brièvement, Les cellules étaient traitées pendant 24h avec les DL₅₀ des GCs en présence de 10µM de l'antagoniste des GRs (RU38486) ou de celui des MRs (RU26752) ou les deux antagonistes en même temps. Ensuite, l'indice de l'activité métabolique des HMEC était estimé par spectrophotomètre à la longueur d'onde correspondant à l'absorbance du MTT. L'intensité de la coloration est fonction du nombre de cellules vivantes.

2.1.2 Résultats

Les voies moléculaires impliquées dans les aspects toxiques des GCs étant mal connues, nous avons choisi d'explorer une éventuelle implication des récepteurs stéroïdiens intracellulaires dans le cadre de nos recherches. Les résultats du test MTT ont montré que l'antagonisme des récepteurs des GCs n'avait aucun effet protecteur sur les cellules endothéliales. Bien au contraire, la présence d'antagonistes a accentué la mort cellulaire par rapport aux cellules traitées avec les GCs. Par ailleurs, nous avons constaté que le simple blocage des récepteurs MRs ou GRs, en absence de GCs, induisait environ 30% de mort cellulaire par rapport au contrôle non traité, ce qui suggère l'importance de l'activité de ces récepteurs dans la physiologie de base des cellules. De plus, cette mort était plus marquée quand les deux récepteurs MRs et GRs étaient inhibés (Figure 32). Ce résultat écarte l'implication des récepteurs MRs et GRs des mécanismes toxiques constatés lors de nos expériences et ouvre la voie à de nombreuses perspectives. Les résultats de notre expérience ont été comparés avec le

test non-paramétrique ANOVA associé au test de Benfferoni. *** $P \leq 0.001$ est considéré comme statistiquement significatif.

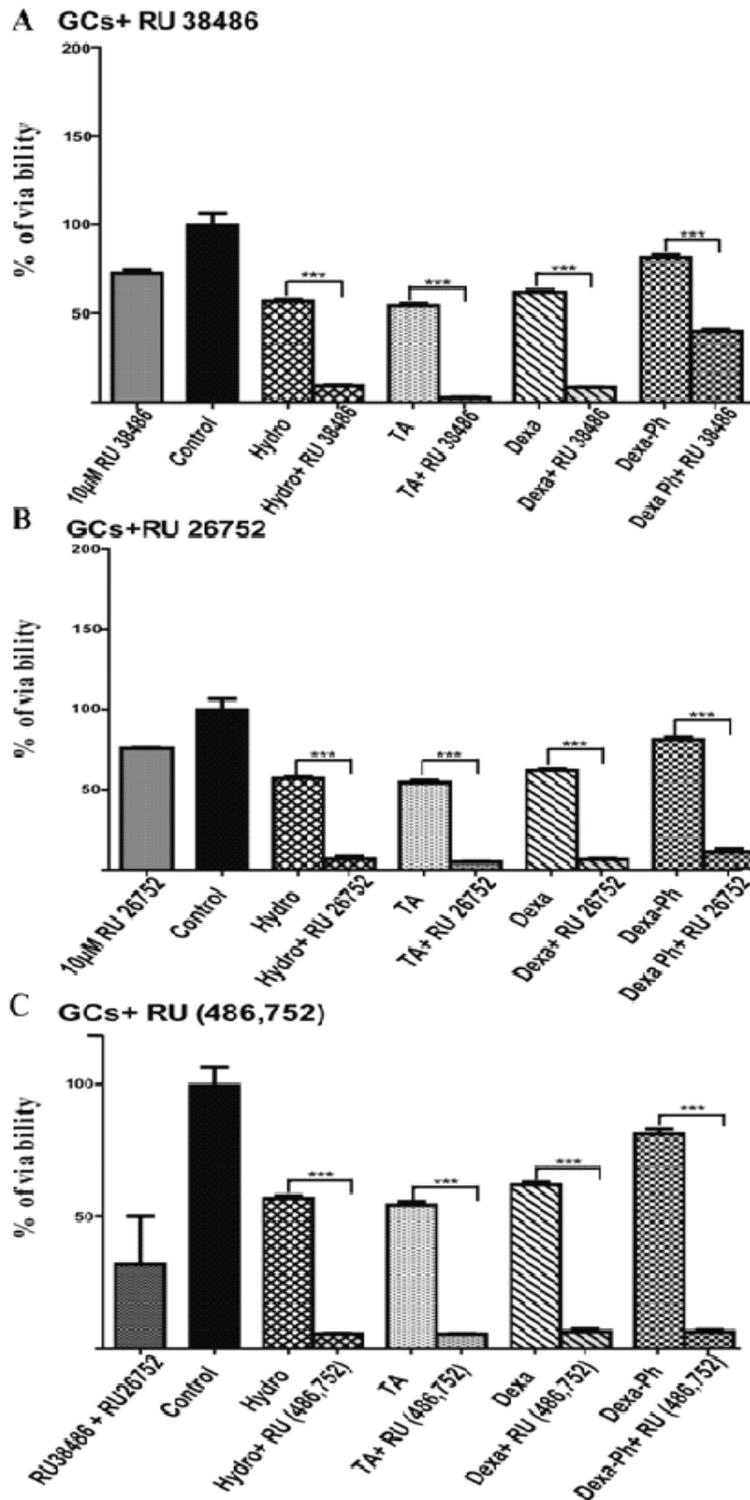


Figure 32 : La viabilité cellulaire estimée par le test MTT, dans les HMEC après 24 heures de traitement par les GCs, et/ou les antagonistes pharmacologiques des leurs récepteurs glucocorticoïdes (RU 486) et minéralocorticoïdes (RU 754) ou les deux ensemble. A) Représente l'effet de l'antagonisme des RG par le RU 486. B) exprime les conséquences de l'antagonisme des RMs par le RU 754 et C) montre l'impacte d'un double antagonisme RG et RM. * $p \leq 0.001$.

3 XG-102, un agent thérapeutique de substitution aux GCs dans l'inflammation oculaire?

La dernière partie est orientée vers l'éventualité de l'existence d'une molécule à potentiel anti-inflammatoire qui pourrait être employée comme un traitement de substitution aux GCs en ophtalmologie.

Récemment, notre équipe a montré le pouvoir anti-inflammatoire de XG-102, un peptide qui inhibe sélectivement la c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK), qui est connu pour ses vertus anti-inflammatoires et son innocuité dans d'autres modèles cellulaires, et avait efficacement réduit l'inflammation intraoculaire dans un modèle d'uvéite induite par l'endotoxine chez le rat (EIU), après administration intravitréenne (IVT) et intraveineuse (IV).

Dans le cadre de cette démarche d'innovation thérapeutique et en se basant sur les travaux réalisés dans notre laboratoire, nous avons confirmé l'efficacité thérapeutique et vérifié le pouvoir anti-inflammatoire de XG-102 par voie sous-conjonctivale (SCJ), une voie moins invasive que les précédentes et qui a plus d'avenir en application clinique.

Nous avons évalué l'effet dose-réponse d'une gamme de concentrations croissantes de XG-102, par l'administration par voies IV, IVT et SCJ, dans le traitement de l'uvéite induite par une endotoxine (EIU) chez le rat Lewis Albinos. Les résultats de ce travail sont présentés dans l'article suivant.

Récemment, la première étude clinique pilote évaluant l'effet anti-inflammatoire de l'injection sous-conjonctivale de XG-102 a été menée en milieu hospitalier. En effet, un essai clinique de phase Ib (numéro EudraCT: 2011-000171-14) a été effectué pour évaluer l'innocuité et la tolérance de XG-102 injectée en sous-conjonctivale. Les résultats ont démontré une très bonne tolérance.

Sub-conjunctival injection of XG-102, a c-Jun N-terminal kinase inhibitor peptide, in the treatment of endotoxin-induced uveitis in rats.

Ikram El-zaoui^{1,2,3}, Elodie Touchard^{1,2,3}, Marianne Berdugo^{1,2,3}, Claire Abadie⁴, Laura Kowalczyk^{1,2,3}, Catherine Deloche⁴, Min Zhao^{1,2,3}, Marie-Christine Naud^{1,2,3}, Jean-Marc Combette⁴, Francine Behar-Cohen^{1,2,3,5}.

¹INSERM UMRS 872, Team 17 Physiopathology of Ocular Diseases: Therapeutic Innovations, Paris, France.

²Pierre et Marie Curie University, Centre de Recherches des Cordeliers, Paris, France.

³Paris Descartes university, UMRS 872, Paris, France.

⁴Solid Drug Development S.A., Geneva, Switzerland.

⁵Sorbonne Paris Cité, Paris Descartes university; AP-HP Hôtel-Dieu, department of ophthalmology, Paris, France.

ABSTRACT

[Purpose] XG-102, a TAT-coupled dextrogyre peptide inhibiting the c-Jun N-terminal kinase was shown efficient in the treatment of experimental uveitis. Optimal XG-102 dose and route of administration are now determined in endotoxin-induced uveitis (EIU) in rats.

[Methods] EIU was induced in Lewis rats by lipopolysaccharide (LPS) injection. XG-102 was administered at the time of LPS challenge either by intravenous (IV; 3.2, 35 or 355 µg/injection), intravitreal (IVT; 0.08, 0.2 or 2.2 µg/eye) or sub-conjunctival (SCJ; 0.2, 1.8 or 22 µg/eye) injections. Controls received either the vehicle (saline) or Dexamethasone phosphate injections. Efficacy was assessed by clinical scoring, infiltrating cells count, and expression of inflammatory mediators (iNOS, CINC-1). Effect of XG-102 on phosphorylation of c-Jun was evaluated on Western-blot.

[Results] XG-102 clinically demonstrated a dose-dependent anti-inflammatory effect in EIU after IV and SCJ administrations. The respective doses of 35 µg and 1.8 µg were efficient as compared with the vehicle-injected controls, but only the highest doses, respectively 355 µg and 22 µg, were as efficient as Dexamethasone phosphate. After IVT injections, the anti-inflammatory effect of XG-102 was clinically evaluated similar to the corticoid's effect with all the tested doses. Whatever the administration route, the lowest efficient doses of XG-102 targeted efficiently the c-Jun N-terminal kinase, reduced cells infiltration in the treated eyes as well as inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) expression in the retina.

[Conclusion] These results confirm that XG-102 have potential for treating intraocular inflammation. Due to the high dose used during systemic treatment and the risk of complications of intravitreal injections, sub-conjunctival delivery appeared as a good compromise to provide a therapeutic effect while limiting side effects.

Introduction

Uveitis has an annual incidence of 52 cases per 100,000, resulting in a prevalence of about 115 per 100,000 [1]. Acute anterior uveitis (AAU) is by far the most common form of uveitis representing around 80% of the cases. Its recurrent nature may result in secondary complications such as cataract, cystoid macular edema, glaucoma and, ultimately, destruction of the intraocular tissues and blindness [2, 3]. Current treatments for uveitis include corticosteroids [4], immunosuppressive agents as tumor-necrosis factor-alpha (TNF- α) inhibitors and cyclosporine in corticosteroid-resistant cases, or chemotherapeutic agents as cyclophosphamide in severe uveitis. These pharmacological agents are delivered through topical and peri-ocular routes in AAU that are not associated with systemic diseases. Corticosteroids agents show clear clinical benefits but their chronic use is associated with many sight-threatening side effects, such as glaucoma, cataract, whilst systemic immunosuppressive agents are associated with general side-effects [1, 5]. Given these restrictions, there is an obvious demand for the development of new local therapeutic strategies [6].

Current clinical trials concern the development of sustained-release delivery system like corticosteroid intravitreal implants [7] as well as new immunosuppressive drugs as anti-inflammatory cytokines: new anti-TNF- α agents, interleukin (IL) receptors as IL-6R and IL-1R, interferon-gamma (IFN- γ) antagonists...[8, clinicaltrials.gov]. Many of the gene products involved in the inflammatory response are regulated by the transcription factor activator protein-1 (AP-1) and the c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) pathways: TNF- α , IFN- γ , IL-2, membrane cofactor protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 α), cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS)...

Among all the anti-inflammatory strategies in development, JNK inhibitors have been shown effective in various models of inflammation [9, 10] and could therefore be an interesting

alternative to corticosteroid treatments in AAU. XG-102 is a TAT-coupled dextrogyrepeptide which selectively inhibits the c-Jun N-terminal kinase in vitro. This peptide contains a 19-amino acid sequence of the JNK binding domain of islet-brain-1 (IB-1)/JNK-interacting protein-1 (JIP-1), a scaffold protein, combined to a 10-amino acid TAT sequence of the HIV TAT protein, allowing its intracellular penetration. The D-retro-inverso peptide - the reversed sequence of the D-amino acid form - retains the capacity of JNK inhibition and translocation, but has an extended activity due to its resistance to degradation by proteases [11].

In a previous study, we showed that XG-102, administered either via intravitreal (IVT) or intravenous (IV) injections, efficiently inhibited intraocular inflammation in a rat model of endotoxin-induced uveitis (EIU), bringing the proof of concept that JNK inhibition could have therapeutic potential in the treatment of uveitis [12]. In the prospect of further clinical applications, other less invasive routes of administration might be more appropriate. In the present study, we have evaluated XG-102 dose dependent effects on EIU in rats using different routes of administration: IV, IVT or sub-conjunctival (SCJ) injections.

Material and Methods

Animals

Seven-week-old female Lewis rats (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France), weighing around 175 g, were used for experiments. All animals were treated according to the European Convention and to the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research (French decree No.2001-486, dated June 06, 2001). Rats were anesthetized with intramuscular injection of ketamine (Ketamine Virbac[®], 88 mg/kg; Virbac, France) and chlorpromazine (Largactil[®], 0.6 mg/kg; Sanofi-Aventis, Paris, France) before IV or ocular injections. Rats were sacrificed by a lethal dose of pentobarbital.

Endotoxin-Induced Uveitis (EIU) induction and experimental design

EIU is a model of acute and predominately anterior uveitis in rats [13-14]. Eighty two female Lewis rats were randomly divided into fifteen groups of three to nine animals each. EIU was induced by a single footpad injection of 100 μ L sterile pyrogen-free saline containing 200 μ g of lipo-polysaccharide (from *Salmonella typhimurium*, Sigma-Aldrich, France). Animals were treated with XG-102 immediately before EIU induction by IV injection (100 μ L), or by local (SCJ or IVT) injections in the right eye (5 μ L). Contralateral left eyes were not treated. XG-102-treated rats were compared with control uveitic rats injected with the vehicle (NaCl 0.9%) or with Dexamethasone phosphate that was used as positive control for anti-inflammatory activity on EIU. Clinical ocular inflammation was scored 24 hours after EIU induction. At this time-point, retinal pigment epithelium (RPE)-choroid-sclera complexes and neuroretinas were carefully dissected from the enucleated eyes, snap frozen, and stored at -80°C until use, respectively, for the analysis of c-Jun phosphorylation state by Western blot and for evaluation of inflammatory mediators (iNOS and cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) expression by RT-PCR. Tissues were collected from eyes treated with XG-102, with the vehicle and non injected eyes. Three eyes collected from these groups were kept to evaluate inflammatory cell infiltration in ocular tissues.

Solutions and Injections

XG-102 peptide was produced and purified by Polypeptide Laboratories (Strasbourg, France). Once lyophilized; XG-102 powder was dissolved in the vehicle (NaCl 0.9%, Versol; Aguetant, Lyon, France) at the concentration of 5 mg/mL under sterile conditions, and stored at -80°C until use. For each experiment, XG-102 solutions were prepared extemporaneously at the required concentration in the vehicle. A fraction of each diluted solution was stored at -

80°C until its assay by HPLC. A commercial solution of Dexamethasone phosphate at 4 mg/mL (Soludecadron; Laboratoire Roussel, Paris, France) was used as positive control.

In our previous study, the anti-inflammatory effect of XG-102 in EIU was demonstrated with IV dose of 20 µg/kg (3.5 µg/rat weighting 175 mg) and IVT dose of 0.2 µg/eye [12]. Based on these results, three doses were chosen per route of administration. Three solutions were prepared at 32, 350 and 3550 µg/mL for IV injections. For the local treatments, three dilutions per type of injections were prepared: XG-102 solutions at 17.43 and 430 µg/mL for IVT injections and solutions at 30, 360 and 4400 µg/mL for SCJ injections.

For the systemic treatment evaluation, 100 µL of vehicle, Dexamethasone phosphate (400 µg/injection) or XG-102 (3.2, 35 or 355 µg/injection) were injected in the tail vein with a 25-gauge needle connected to a 1 mL syringe (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). For the local delivery study, 5 µL of vehicle Dexamethasone phosphate (20 µg/eye) or XG-102 solutions were injected in the right eye using a 30-gauge disposable needle (BD-microfine syringes; nm Medical, Asnières, Paris, France). In the XG-102-treated groups, right eyes received 0.08, 0.2 or 2.2 µg of XG-102 through IVT injection, and 0.2, 1.8 or 22 µg through SCJ injection.

Clinical assessment of EIU

Clinical examinations were performed by slit lamp microscopy 24 hours after EIU induction. The severity of uveitis was scored, in a masked manner, on a scale from 0 to 5 for each eye, as described previously [15] grade 0, no inflammation; grade 1, minimal iris and conjunctival vasodilation but without the observation of flare or cells in the anterior chamber; grade 2, moderate iris and conjunctival vessel dilation but without evident flare or cells in the anterior chamber; grade 3, intense iris vessels dilation, flare, and fewer than 10 cells per slit lamp field in the anterior chamber; grade 4, more severe clinical signs than grade 3, with cells in the

anterior chamber, with or without the formation of hypopyon; grade 5, intense inflammatory reaction, fibrin formation in the anterior chamber, and total seclusion of the pupil.

Western Blot analysis of the phosphorylated form of c-Jun (phospho c-Jun)

RPE-choroid-sclera complexes were snap frozen immediately after dissection and stored at -80°C until use. Tissues were homogenized in 500 µL of lysis buffer, consisting in MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with a cocktail of protease (Roche Diagnostics, Meylan, France) and phosphatase (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) inhibitors. After heating for 5 min at 100°C, equal amounts of proteins were separated by electrophoresis in a NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel (Invitrogen) using MOPS SDS Running Buffer. The bands obtained were then electroblotted onto a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell BioScience, Dassel, Germany). Blots were sequentially incubated with a rabbit anti-Phospho-c-Jun (Ser 63) primary antibody and an anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)-linked secondary antibody according to the manufacturer's instruction (Cell Signaling Technology, Ozyme, St Quentin en Yvelines, France). Bands were visualized using the ECL Western Blotting Detection Reagents Kit (Amersham Biosciences, Orsay, France). Blots were then dehybridized and rehybridized successively with a mouse monoclonal anti α -tubulin primary antibody (1:400; Serotec, Düsseldorf, Germany) and a HRP conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody (1:5000; Santa Cruz Biotechnology, Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France). The relative band intensity for phospho c-Jun was calculated in comparison to that for α -tubulin after densitometry analysis (on ImageJ software).

Evaluation of inflammatory cells infiltration using immuno-histochemistry

For immunohistochemical analysis, eyeballs were enucleated, fixed for 1 hour at room temperature in phosphate-buffered saline (PBS) containing 4% paraformaldehyde and rinsed

overnight in PBS. After careful orientation, samples were embedded in optimal cutting temperature compound (Tissue-Tek; Sakura Finetek, Zoeterwoude, The Netherlands) and stored at -80°C. Frozen 10-µm sections were collected on Superfrost slides (Gerhard Menzel, Braunschweig, Germany) using a cryostat (CM 3050S; Leica, Rueil-Malmaison, France). The frozen 10-µm sections collected at the optic nerve level were stained 5 min with 4', 6-diamidino-2-phenylindole solution (DAPI, 1:5000; Sigma-Aldrich), mounted in PBS:Glycerol (1:1) and examined with a fluorescence microscope Olympus BX51 (Rungis, France) coupled with a digital camera Olympus DP70. Polymorphonuclear (PMN) cells, identified by the shape of their nuclei stained with DAPI, were quantified on three different frozen slides per eye (n=3 eyes per group). Results were expressed as mean ± SEM.

Evaluation of inflammatory mediators expression (iNOS, CINC-1) using RT PCR

Selected doses of XG-102 were used to evaluate the expression of iNOS mRNA (3.2 and 35 µg for IV injection, 0.2 and 2.2 µg for IVT and 1.8 µg for SCJ injection) and CINC-1 mRNA in eyes (35 µg for IV injection, 0.2 µg for IVT and 1.8 µg for SCJ injection).

Total RNA was extracted from the neuroretinas stored at -80°C according to the manufacturer's instructions (RNeasy minikit, Qiagen, France). For each sample, 1 µg total RNA was readjusted according to the RNA optic density at 260 nm and transcribed in a total volume of 20 µL using Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, France) following the manufacturer's instructions.

Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), iNOS and CINC-1 cDNA were amplified in a total volume of 25 µL containing 2 µL of first-strand reaction product, 0.4 µM of each primer (sense and antisense), 0.4 µM dNTP Mix, 1.5 mM MgCl₂, 1X PCR buffer and 2.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, France). Primers specific for GAPDH (sense: 5'-ATGCCCCCATGTTTGTGATG-3'; antisense: 5'-ATGGCATGGACTGTGGTCAT-3'), primers specific for CINC-1 (sense: 5'-GGGTGTCCCCAAGTAATGGA-3'; anti-sense: 5'-

CAGAAGCCAGCGTTCACCA-3') and primers specific for iNOS (sense: 5'-TTTCTCTTCAAAGTCAAATCCTACCA-3'; antisense: 5'-TGTGTCTGCAGATGTGCTGAAAC-3') were obtained from Invitrogen. After an initial denaturation (1 min at 94°C), 34 to 37 PCR cycles of denaturation (30 s at 94°C), annealing (1 min at 58°C for GAPDH, at 60°C for CINC and at 52°C for iNOS) and elongation (1-2 min at 72°C) were performed on a Crocodile III (Appligene-Oncor). The final cycle was completed by 5 min of elongation at 72°C. PCR fragments (162 bp for GAPDH, 53 bp for CINC and 657 bp for iNOS) were analyzed by 2.5% agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining under ultraviolet light. The relative bands intensity for CINC-1 and iNOS were calculated in comparison to that for GAPDH after densitometry analysis using ImageJ software.

Statistical analysis

Numerical results were expressed as mean \pm standard error mean (SEM) and compared using the nonparametric Mann-Whitney U-test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

XG-102 clinical effect on EIU using different routes of administration

Clinical scores were evaluated 24 hours after EIU induction which is the peak of inflammation in this model. Using either IV or SCJ injections (Fig 1 A and C), a dose-response effect was observed: the lowest doses (3.2 μg for IV and 0.2 μg for SCJ) were not efficient; increasing the dose induced increased anti-inflammatory effects. At the highest tested doses (350 μg IV and 22 μg SCJ), no significant difference in the anti-inflammatory effects was observed between XG-102 and Dexamethasone phosphate, used as a positive control. The highest SCJ dose (22 μg) also significantly reduced inflammation in the contra lateral uninjected eye, suggesting a systemic passage of XG-102 at high dose. Using IVT injections, all tested doses significantly reduced intraocular inflammation with the same efficacy as Dexamethasone phosphate but with a reverse dose-response effect: the higher the dose, the less efficient is the drug (Fig 1B).

Effect of XG-102 on in vivo JNK phosphorylation

Western-blot analysis of the RPE-choroid-sclera complex collected at the peak of the disease demonstrated a reduced phosphorylation of c-Jun on Ser63 residue, using IV, SCJ and IVT (Fig 2). The densitometry analysis of Western blot showed a decrease in State of c-Jun phosphorylation in the samples either after 35 μg -XG-102 IV injection (0.284 vs 2.075 in vehicle IV; Fig 2A) or 1.8 μg -XG-102 SCJ injection (0.222 vs 1.436 in vehicle SCJ; Fig 2C). In the same manner, a reduction of c-Jun phosphorylation was observed in RPE-choroid-sclera complex after 0.2 μg -XG-102 IVT injection (0.205 vs 1.086 in vehicle IVT; Fig 2B).

Effect of XG-102 on ocular cell infiltration

Identified by the shape of their nuclei, stained with DAPI, polymorphonuclear cells (PMN) cells were quantified on histological sections of the ocular tissues. One day after 35 μg -XG-102 IV delivery, the PMN cells infiltration decreased by 38% compared with vehicle IV

injection (342 ± 50 vs 552 ± 151 , Fig 3A). Using IVT, 0.2 μg -XG-102 delivery decreased by 48% the number of infiltrating cells as compared with the vehicle-injected eyes (97 ± 38 vs 186 ± 65 , Fig 3B). XG-102 SCJ administration decreased by 57% the PMN infiltration in the eyes treated with 1.8 μg XG-102 as compared with the vehicle delivery (177 ± 41 vs 415 ± 87 , Fig 3C).

Expression of pro-inflammatory mediators

XG-102 reduced iNOS expression in ocular tissues whatever the route of administration.

In comparison with the vehicle-injected eyes, IV injections of 35 μg XG-102 led to the downregulation of iNOS mRNA from 1.067 ± 0.037 to 0.390 ± 0.218 (-64%, Fig 4A). In IVT injected eyes with 0.2 μg of XG-102, a 98% reduction in iNOS expression was observed (from 1.040 ± 0.001 to 0.02 ± 0.03 , Fig 4B) and 92% with 2.2 μg XG-102 (from 1.04 ± 0.001 to 0.086 ± 0.06). Using SCJ delivery injection, iNOS expression decreased significantly by 86% in the right eyes treated with 1.8 μg XG-102 as compared with the vehicle delivery (from 1.067 ± 0.037 to 0.100 ± 0.065 ; Fig 4C).

In order to confirm the reduced recruitment of inflammatory cells after XG-102 treatment, the expression of CINC-1, a mediator of neutrophil infiltration in the inflammatory sites, was evaluated in retinal cells at the mRNA level. As compared with the control group, the IV injection of 35 μg of XG-102 reduced the CINC-1 expression from 0.382 ± 0.035 to 0.205 ± 0.063 (Fig 5A). The decrease of CINC-1 mRNA was also observed after IVT injection of 0.2 μg of XG-102, from 0.584 ± 0.150 to 0.202 ± 0.063 as compared with the vehicle-injected eyes (Fig 5B). The SCJ injection of 1.8 μg of XG-102 led to a down-regulation of CINC-1, from 1.05 ± 0.43 to 0.18 ± 0.03 as compared with the vehicle. However, in uninjected eyes no diminution of CINC-1 expression was observed after SCJ administration of 1.8 μg -XG-102 (Fig 5C). These results go hand in hand with the decrease in PMNs infiltration in the eyes

treated with: 35 μg -XG-102 IV, 0.2 μg -XG-102 IVT and 1.8 μg -XG-102 SCJ injections (Fig 3).

Discussion

The JNK pathway is activated in inflammatory reactions in various tissues of the body, particularly the central nervous and the digestive systems [16,17]. Its specific inhibition by XG-102 blocks the phosphorylation of its nuclear target, c-Jun, which prevents the transcription of pro-inflammatory cytokines/chemokines and the activation of the intracellular processes with harmful results, such as cellular death by apoptosis [12, 18, 19]. In this study, we demonstrated that XG-102 exerts anti-inflammatory effects on EIU using IV and IVT, as already shown in our previous study [12], but also using SCJ injections. XG-102 is efficient at low-doses; since the 0.08 μg dose directly injected into the vitreous was already efficient and increasing the dose did not increase the effect. The anti-inflammatory activity was confirmed by reduced cell infiltration in ocular tissues and decreased expression of iNOS and CINC-1 using specific dose for each tested route of administration. Importantly, the anti-inflammatory effect correlated with the decreased phosphorylation of JNK, demonstrating the specific mechanism of action of this drug.

For clinical used, SCJ injection of a D-peptide is particularly interesting. This route of administration is minimally invasive, with no risk of possible infection associated with IVT injections. Moreover, XG-102 has a long half-life in vivo due to its resistance from proteases limiting the need for re-injections [20]. SCJ of 1.8 μg was the lowest dose efficient clinically and biologically. At 22 μg , the uninjected contralateral eye also showed reduced inflammation, suggesting a systemic diffusion of XG-102 after SCJ in the treated eye. However, at a lower dose of 1.8 μg , no effect was observed on the contralateral eye, suggesting a direct transscleral passage of XG-102 after SCJ without systemic diffusion. XG-

102 is a small peptide with a molecular weight of around 2.2 kDa adapted for transscleral diffusion. Indeed, previous works have shown that hydrophilic molecules up to 150 kDa were able to cross the sclera, the scleral permeability being inversely proportional to the molecular weight [21]. Whether direct trans-corneal penetration of XG-102 is occurring remains to be demonstrated. Sub-conjunctival injections are rarely used and no drug is approved for such injections. However, studies comparing the ocular media levels of Dexamethasone phosphate after oral administration, latero bulbar or sub-conjunctival injections in humans, found that the highest concentrations in aqueous and vitreous humors were achieved after SCJ injections.[22,23,24].

This is to our knowledge the first study evaluating the effect of sub-conjunctival injection of a peptide for the treatment of uveitis. A phase Ib clinical trial (EudraCT Number: 2011-000171-14) has been performed to evaluate the safety and tolerance of XG-102 injected sub-conjunctivally. The results demonstrated very good tolerance.

XG-102 injected either sub-conjunctivally or directly in the eye could be used in many ocular diseases, associated with intraocular inflammation and/or excitotoxicity.

References

1. De Smet MD, Taylor SR, Bodaghi B, Miserocchi E, Murray PI, Pleyer U, Zierhut M, Barisani-Asenbauer T, LeHoang P, Lightman S. Understanding uveitis. The impact of research on visual outcomes. *ProgRetin Eye Res* 2011Nov; 30 (6):452-470.
2. Mercieca K, Jones NP. Treatment of acute anterior uveitis in the community, as seen in an emergency eye centre. A lesson for the general practitioner?. *European Journal of General Practice* 2012 Mar; 18(1):26-9.
3. Medeiros R, Rodrigues GB, Figueiredo CP, Rodrigues EB, Grumman A Jr, Menezes-de-Lima O Jr, Passos GF, Calixto JB. Molecular mechanisms of topical anti-inflammatory effects of lipoxin A(4) in endotoxin-induced uveitis. *Mol Pharmacol* 2008 Jul; 74:154-161.
4. Taylor SR, Isa H, Joshi L, Lightman S. New developments in corticosteroid therapy for uveitis. *Ophthalmologica* 2010; 224(1):46-53.
5. Agrawal RV, Murthy S, Sangwan V, Biswas J. Current approach in diagnosis and management of anterior uveitis. *Indian J Ophthalmol* 2010; 58(1):11-19.
6. Abad S, Sève P, Dhote R, Brézin AP. Uvéites et médecine interne. Stratégies diagnostique et thérapeutique. *La Revue de médecine interne* 2009 Jun; 30(6):492–500.
7. De Smet MD. Corticosteroid intravitreal implants. *Dev Ophthalmol* 2012; 51:122-133.
8. Tsai ML, Horng CT, Chen SL, Xiao X, Wang CH, Tsao YP. Suppression of experimental uveitis by a recombinant adenoassociated virus vector encoding interleukin-1 receptor antagonist. *Molecular Vision* 2009; 15:1542-1552.
9. Han Z, Boyle DL, Aupperle KR, Bennett B, Manning AM, Firestein GS. Jun N-terminal kinase in rheumatoid arthritis. *J Pharmacol Exp Ther* 1999 Oct; 291(1):124-130.
10. Clancy R, Rediske J, Koehne C, Stoyanovsky D, Amin A, Attur M, Iyama K, Abramson SB. Activation of stress-activated protein kinase in osteoarthritic cartilage. Evidence for nitric oxide dependence. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9(4):294-299.

11. Hirt L, Badaut J, Thevenet J, Granziera C, Regli L, Maurer F, Bonny C, Bogousslavsky J.D-JNKI1, a Cell-Penetrating c-Jun-N-Terminal Kinase Inhibitor, Protects Against Cell Death in Severe Cerebral Ischemia. *Stroke* 2004; 35:1738-1743.
12. Touchard E, Omri S, Naud MC, Berdugo M, Deloche C, Abadie C, Jonet L, Jeanny JC, Crisanti P, De Kozak Y, Combette JM, Behar-Cohen F. A peptide inhibitor of c-jun N-terminal kinase for the treatment of endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sc* 2010; 51:4683-4693.
13. Rosenbaum JT, McDevitt HO, Guss RB, Egbert R. Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease. *Nature* 1980; 268:611-613.
14. Hashida M, Fukushima A, Zhang J, Kodama H, Ueno H. Involvement of superoxide generated by polymorphonuclear leukocytes in endotoxin-induced uveitis. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000; 238:359–365.
15. Behar-Cohen FF, Parel JM, Pouliquen Y, Thillaye-Goldenberg B, Goureau O, Heydolph S, Courtois Y, De Kozak Y. Iontophoresis of dexamethasone in the treatment of endotoxin-induced-uveitis in rats. *Exp Eye Res* 1997; 65(4):533-545.
16. Ip YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development. *Current Opinion in Cell Biology* 1998; 10(2):205-219.
17. Willaime-Morawek S, Brami-Cherrier K, Mariani J, Caboche J, Brugg B. C-Jun N-terminal kinases/c-Jun and p38 pathways cooperate in ceramide-induced neuronal apoptosis. *Neuroscience* 2003; 119(2):387-397.
18. Chi ZL, Hayasaka S, Zhang XY, Cui HS, Hayasaka Y. A cholinergic agonist attenuates endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(6):2719-2725.
19. Reinecke K, Eminel S, Dierck F, Roessner W, Kersting S, Chromik AM, Gavriloova O, Laukeviciene A, Leuschner I, Waetzig V, Rosenstiel P, Herdegen T, Sina C. The JNK Inhibitor XG-102 Protects against TNBS-Induced Colitis. *PLoS One* 2012 Mar; 7(3):e30985.

20. Bonny C, Oberson A, Negri S, Sauser C, Schorderet DF. Cell-Permeable Peptide Inhibitors of JNK Novel Blockers of β -Cell Death. *Diabetes* 2001; 50(1):77-82.
21. El Sanharawi M, Kowalczyk L, Touchard E, Omri S, de Kozak Y, Behar-Cohen F. Protein delivery for retinal diseases. From basic considerations to clinical applications. *ProgRetin Eye Res* 2010 Nov; 29(6):443-465.
22. Weijtens O, Feron EJ, Schoemaker RC, Cohen AF, Lentjes EG, Romijn FP, van Meurs JC. High concentration of dexamethasone in aqueous and vitreous after subconjunctival injection. *Am J Ophthalmol* 1999; 128(2):192-197.
23. Weijtens O, Schoemaker RC, Cohen AF, Romijn FP, Lentjes EG, van Rooij J, van Meurs JC. Dexamethasone concentration in vitreous and serum after oral administration. *Am J Ophthalmol* 1998; 125(5):673-679.
24. Weijtens O, van der Sluijs FA, Schoemaker RC, Lentjes EG, Cohen AF, Romijn FP, van Meurs JC. Peribulbar corticosteroid injection. Vitreal and serum concentrations after dexamethasone disodium phosphate injection. *Am J Ophthalmol* 1997 Mar; 123(3):358-363.

Figures and legends

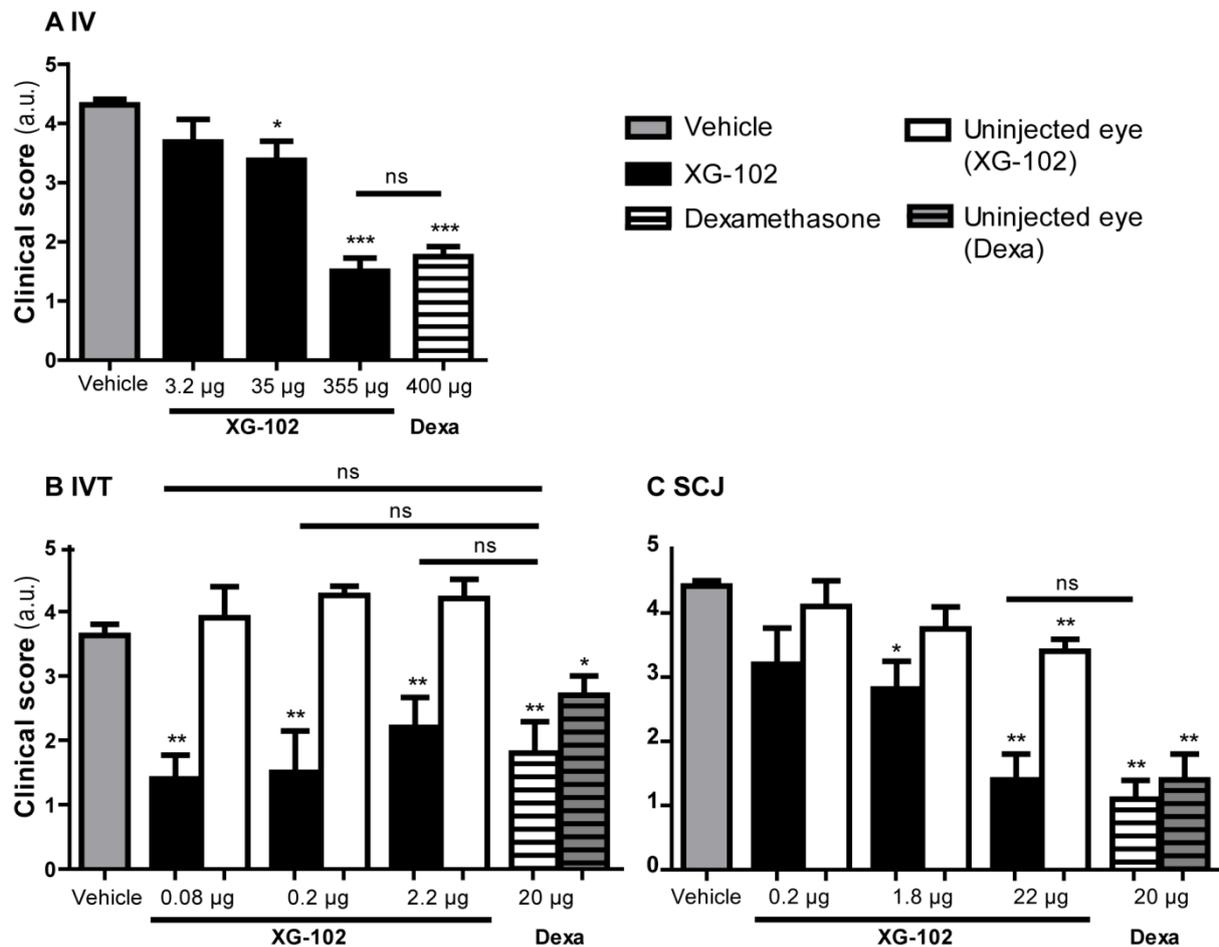


Figure 1: Clinical evaluation of XG-102 efficacy in Endotoxin-Induced Uveitis.

Clinical scores (mean \pm SEM arbitrary units, a.u.) were evaluated at the peak of the disease, 24 hours after intravenous (IV, **A**; $n \geq 8$ eyes per group), intravitreal (IVT, **B**; $n \geq 4$ eyes per group) and sub-conjunctival (SCJ, **C**; $n \geq 5$ eyes per group) injections of different doses of XG-102. Dexamethasone phosphate IV ($n=6$), IVT ($n=5$) or SCJ ($n=5$) injections were used as positive control. Comparisons were respectively made with vehicle IV ($n=8$), IVT ($n=12$) or SCJ ($n=6$) injections. Clinical signs of uveitis were significantly reduced after: (A) IV injections of 35 µg (*) and 355 µg (***) of XG-102; (B) IVT injections of 0.08 (**), 0.2 (**) and 2.2 µg (**) of XG-102; (C) SCJ injections of 1.8 µg (*) and 22 µg (**) of XG-102. No statistical difference (ns) was observed between the clinical scores of the IV-injected 355 µg, the SCJ-injected 22 µg and all the IVT-injected doses and those of the Dexamethasone phosphate groups for the respective routes of administration. * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

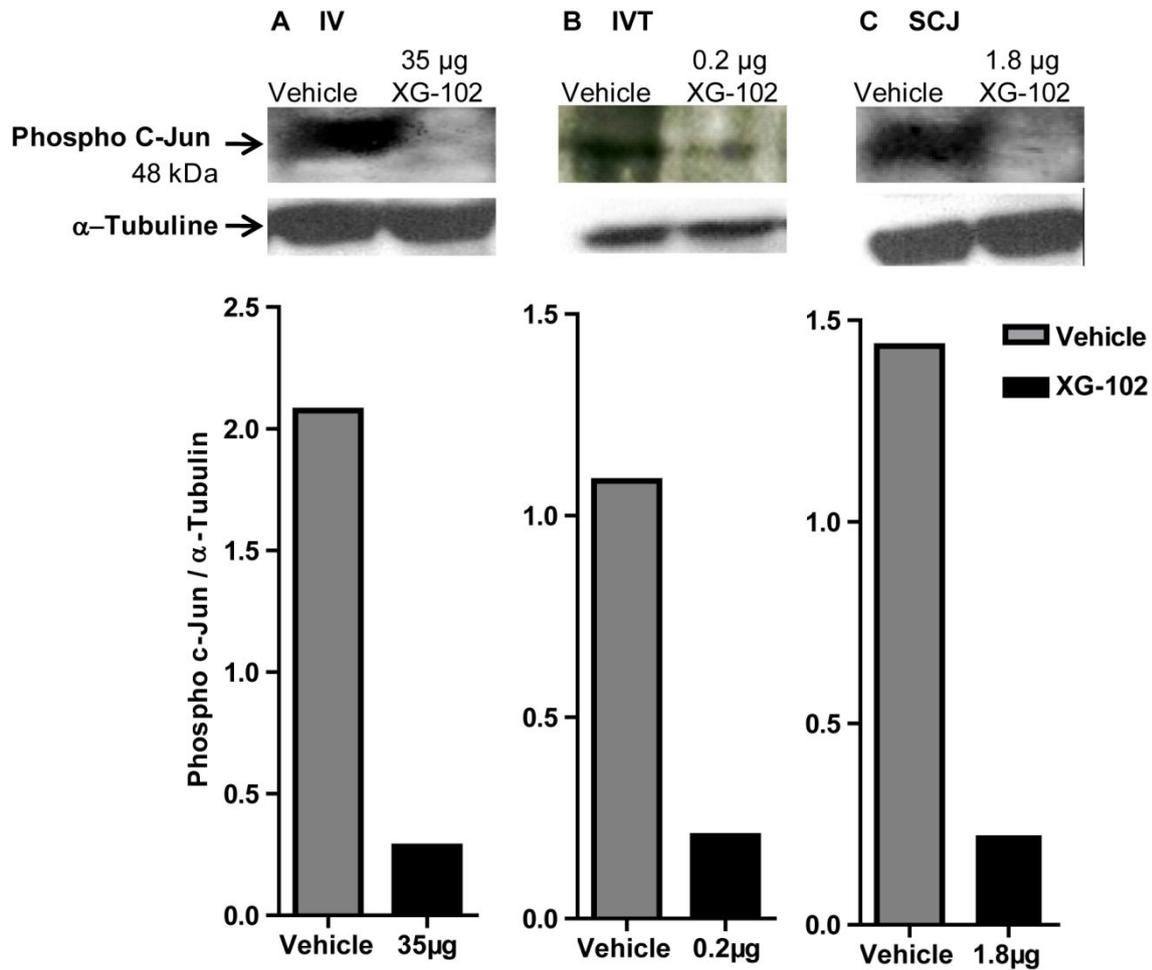


Figure 2: Analysis of c-Jun phosphorylation in “RPE-choroid-sclera” complex.

Western blots were performed 24 hours after intravenous (IV of 35 µg, **A**), intravitreal (IVT of 0.2 µg, **B**) and sub-conjunctival (SCJ of 1.8 µg, **C**) injections of XG-102, and compared to the vehicle-injected eyes (n=2 pooled “RPE-choroid-sclera” complex per group). The **immunoblots (top)** of Phospho c-Jun [Ser 63] and of the α-tubulin reporter protein, and their quantization by **densitometry (bottom)** demonstrated that the phosphorylation of c-Jun was strongly reduced by XG-102 delivered by the three routes of administration.

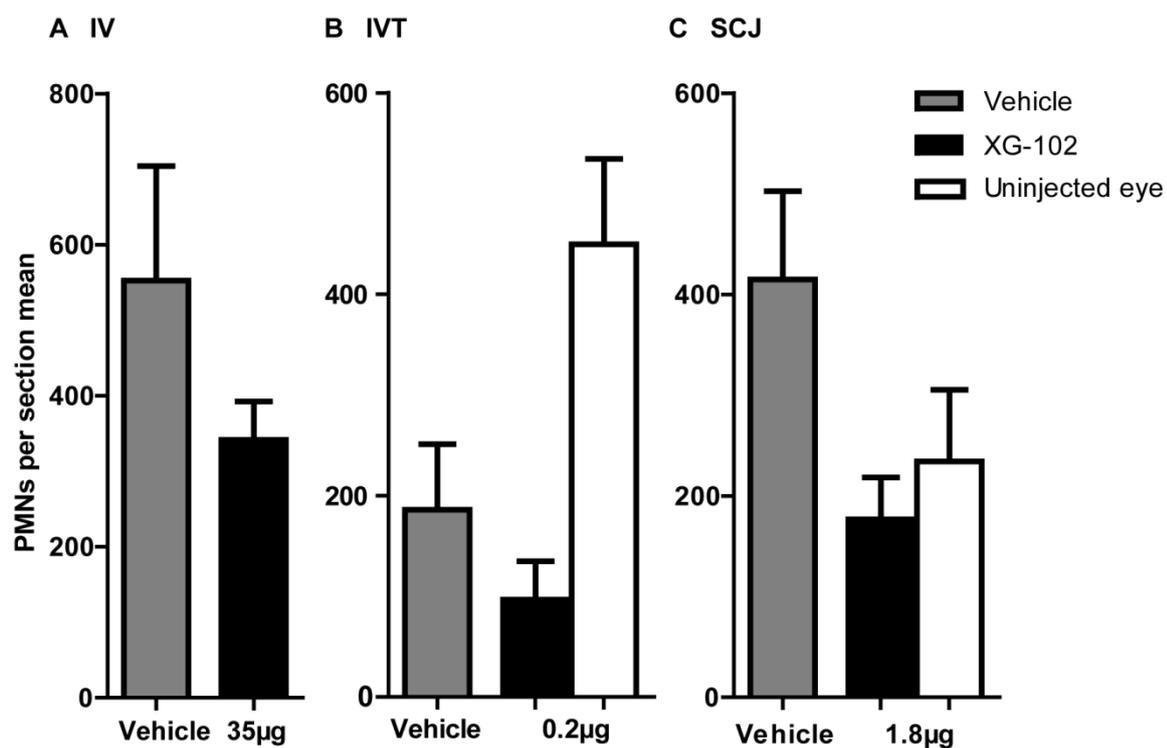


Figure 3: Effect of XG-102 on PMN cells infiltration in ocular tissues.

Polymorphonuclear (PMN) leukocytes infiltration was evaluated 24 hours after EIU induction in eyes treated with 35 μ g-XG-102 IV (A), 0.2 μ g-XG-102 IVT (B) and 1.8 μ g-XG-102 SCJ (C) injections on frozen sections (3 eyes per group, 3 sections per eye).

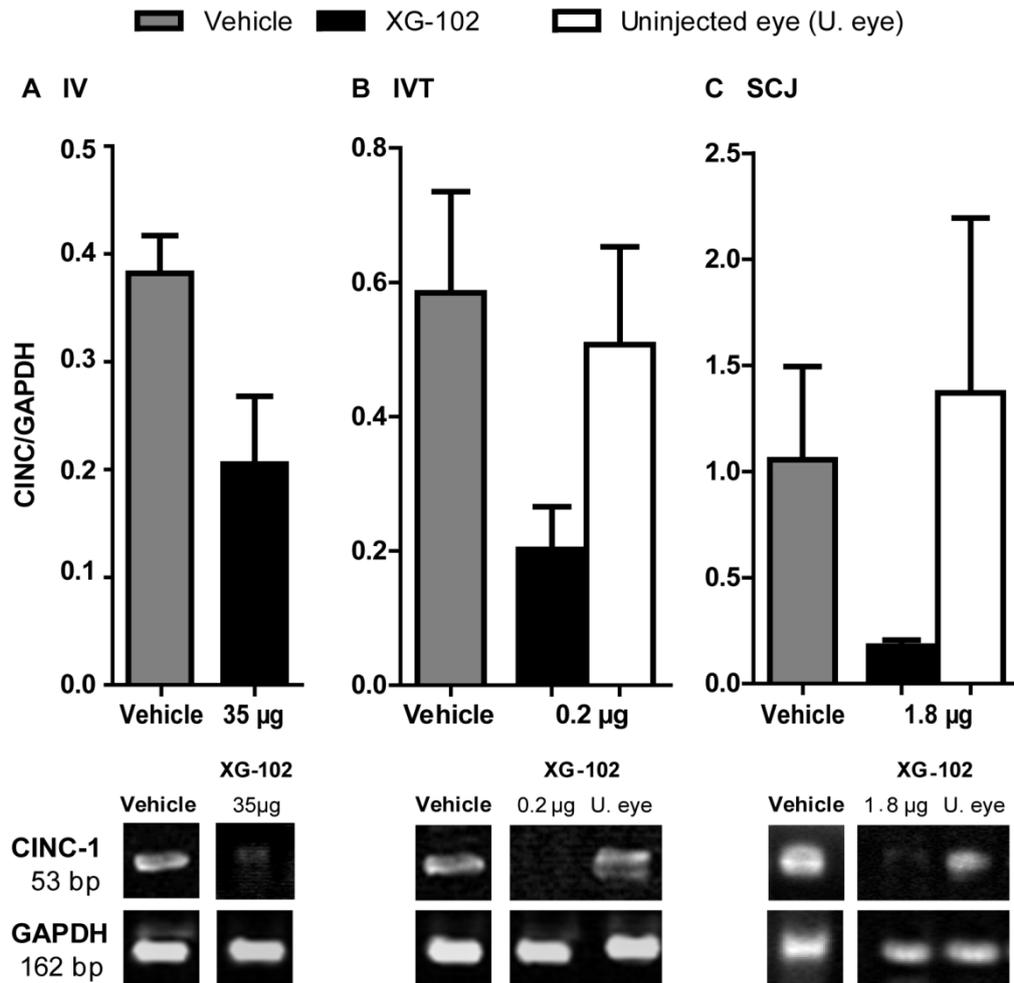


Figure 4: Effect of XG-102 on iNOS expression in neuroretinal cells.

Mean \pm SEM relative band intensity were determined after the detection of iNOS expression in retinal cells of the eyes treated with 3.2 μ g and 35 μ g of XG-102 IV (**A**, $n \geq 3$), 0.2 μ g and 2.2 μ g of XG-102 IVT (**B**, $n \geq 2$) and 1.8 μ g XG-102 SCJ (**C**, $n = 3$) injections and compared with those of the control vehicle-injected eyes, 24 hours after EIU induction. Representative RT PCR products visualized by ethidium bromide staining are shown in the *bottom plan*. * $P < 0.05$.

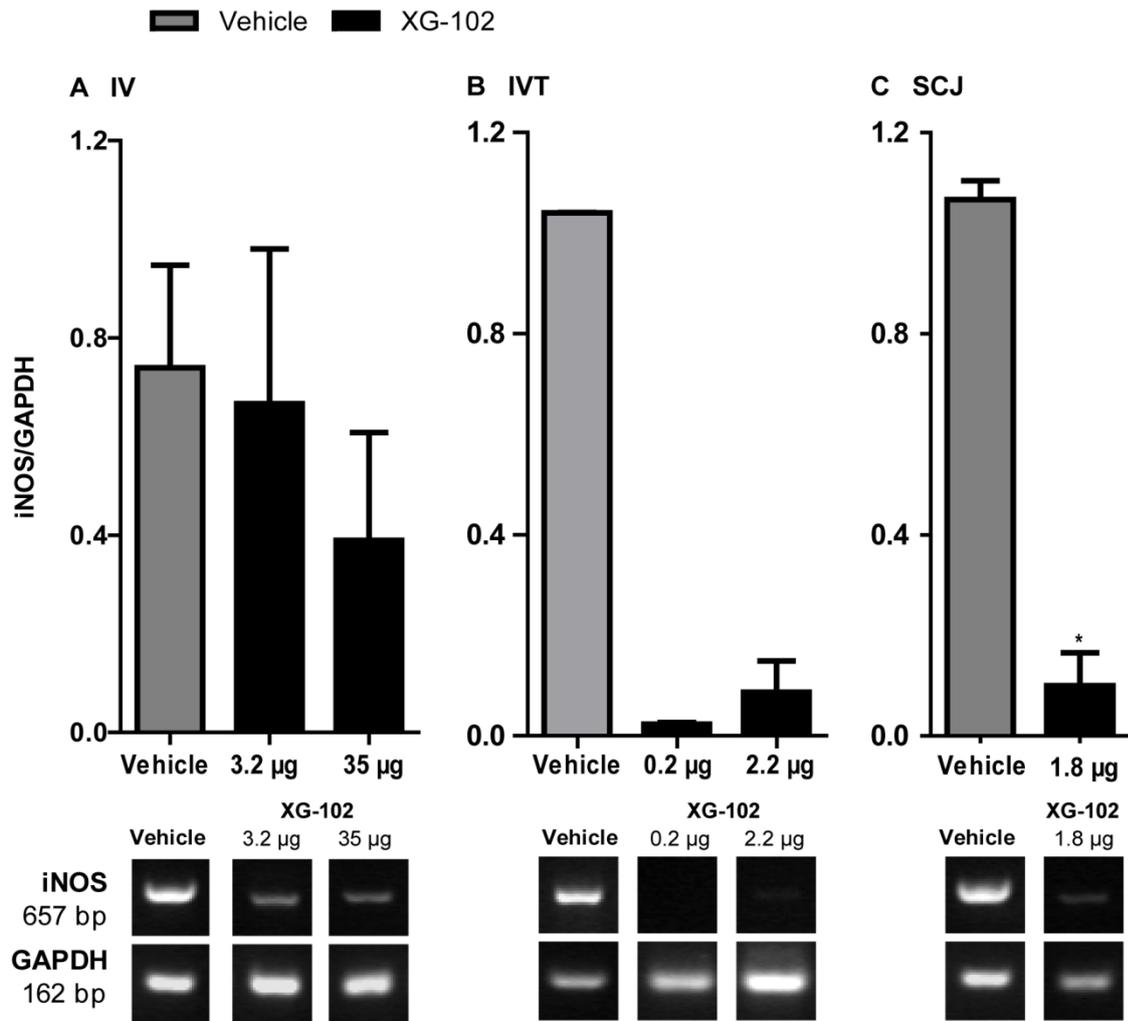


Figure 5: Effect of XG-102 on CINC-1 expression in neuroretinal cells.

Mean \pm SEM relative band intensity were determined after the detection of CINC-1 expression in retinal cells of the eyes treated with 35 μ g of XG-102 IV (A, $n \geq 2$), 0.2 μ g of XG-102 IVT (B, $n \geq 3$) and 1.8 μ g-XG-102 SCJ injection ($n \geq 3$) and compared with that of vehicle control eyes, 24 hours after EIU induction. Representative RT PCR products visualized by ethidium bromide staining are shown in the *bottom plan*.

Chapitre III Discussion

1 Les effets des glucocorticoïdes sur l'endothélium microvasculaire : Synthèse Générale.

En se basant sur des données fondamentales et cliniques, nous avons émis l'hypothèse de l'existence d'une corticotoxicité relative aux cellules endothéliales, que nous avons étudiée en comparant leur réponse à différents types de glucocorticoïdes (GCs). Le potentiel toxique des GCs était évalué, après 24 heures de traitement par les doses létales médianes, en étudiant des mécanismes de mort cellulaire apoptotiques (Caspase-3, AIF et LEI/L-DNaseII) et non apoptotiques (Nécrose et autophagie). Dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité d'une nouvelle molécule à visée thérapeutique en ophtalmologie, les effets anti-inflammatoires de XG-102 ont été évalués dans le modèle d'uvéite expérimentale chez le rat

1.1 Choix du traitement et des doses (cellules endothéliales)

De prime abord nous avons sélectionné les GCs en tête de liste des prescriptions médicales : La Triamcinolone Acétonide (TA), la Dexaméthasone (Dexa), la Dexaméthasone-Phosphate (Dexa-Ph) et l'Hydrocortisone (Hydro). En pratique clinique, ces GCs sont employés à différentes doses ce qui rendait la comparaison de leurs effets secondaires difficile vue que nous ne sommes pas au même niveau de toxicité. Pour pallier cet inconvénient nous avons déterminé *in vitro* la dose létale médiane (DL_{50}) de chaque principe actif. La DL_{50} est un indicateur de mesure qui exprime la quantité de produit induisant la mort de la moitié de la population dans les conditions expérimentales et renseigne partiellement sur la toxicité du médicament. Il s'agit d'un paramètre de mesure employé chez les rats et les souris (Dans notre cas c'est abus de langage) (Tableau 2). La DL_{50} est déterminée en quantifiant la mort cellulaire par la technique MTT (257). Le MTT est un test colorimétrique qui se base sur la transformation d'un sel de tétrazolium en cristaux solubles de formazan par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Etant donné que le MTT est un indicateur de l'intégrité et de l'activité mitochondriale assimilable à la survie cellulaire, nous l'avons utilisé comme indicateur de la survie cellulaire. Ceci dit, et afin d'étayer cette présomption nous avons préalablement corrélé les résultats de ce test à un comptage des cellules marquées au bleu trypan, un colorant vital exclu par les cellules vivantes, pour s'assurer que, chez ce type cellulaire, l'intensité de la coloration est fonction du nombre de cellules vivantes.

Les glucocorticoïdes lipophiles comme la TA et la Dexa, lorsque leurs concentrations respectives excèdent 36µg/ml et 92µg/ml, forment des cristaux responsables d'une toxicité additionnelle par contact direct sur les cellules (126) (258-260). Pour cette raison, nous avons travaillé en milieu alcoolique, l'éthanol 1%, dans lequel les GCs lipophiles (TA, Dexa et Hydro) étaient solubilisés.

Dans nos expériences *in vitro* lorsque les cellules endothéliales sont exposées à l'éthanol 1% aucune toxicité n'a été décelée. Ceci révèle que l'éthanol 1% n'est pas nocif pour les cellules contrairement à certains excipients des préparations galéniques (Kenacort®) utilisées en clinique. En effet, la cytotoxicité de l'alcool benzylique, employé comme solubilisant de la TA dans le Kenacort, était mise en cause dans plusieurs études, ce qui a conduit à recommander d'enlever les conservateurs des formulations avant de les administrer dans l'œil (261-262).

Doses létales médianes (DL50) des glucocorticoïdes				
	Hydrocortisone	Triamcinolone Acetonide	Dexamethasone	Dexamethasone phosphate
HMEC	0.1mg/ml	0.1mg/ml	0.1mg/ml	1mg/ml
BREC	0.5mg/ml	0.2mg/ml	0.3mg/ml	1mg/ml

Tableau 2 : Récapitulatif des doses de glucocorticoïdes induisant 50% de mort cellulaire après 24 heures de traitement dans les HMEC et les BREC.

Afin d'étudier si le phénomène de toxicité est spécifique à chaque type de cellule microvasculaire, ou s'il s'agit plutôt d'un processus général, commun à toutes les cellules, quelque soit leur origine, nous avons évalué *in vitro* l'impact des traitements par les GCs sur les cellules endothéliales humaines de la microcirculation dermique (HMEC) puis nous avons comparé aux résultats obtenus sur les cellules endothéliales de la microcirculation rétinienne bovine (BREC) et *ex-vivo*, sur la vascularisation interne de rétine de rat montée à plat. (Toutes les expériences ont été réalisées avec les DL₅₀ pendant 24 heures).

1.2 Choix du modèle d'étude

Il est clairement établi que chaque organe possède un système vasculaire différent sur le plan anatomique qui répond à ses besoins métaboliques et physiologiques spécifiques. Le réseau vasculaire est un assemblage complexe de vaisseaux de gros diamètre (macrocirculation) et de vaisseaux de petit diamètre (microcirculation). Ces deux systèmes présentent des structures et des propriétés différentes. Les gros vaisseaux ont, par exemple, la propriété d'être élastiques ce qui leur permet de réguler la pression sanguine et de protéger la microcirculation en aval. Les petits vaisseaux, quant à eux, produisent de fortes résistances à l'écoulement du sang ce qui permet la perfusion des tissus (263).

Sur le plan anatomique et histologique, les microvaisseaux diffèrent eux aussi selon les organes; à titre d'exemple, l'endothélium tapissant les vaisseaux cérébraux est particulièrement imperméable en raison de la présence des jonctions serrées entre les cellules endothéliales (elles constituent une partie essentielle de la barrière hémato-encéphalique). L'endothélium de la rétine possède également des jonctions serrées dont la structure continue est surmontée par un grand nombre de péricytes protecteurs. En revanche, l'endothélium des glandes endocrines, telle que la surrénale, est fenêtré et perméable ce qui permet le passage des stéroïdes dans le sang (264). La survenue d'altérations microcirculatoires est associée au développement de dysfonctions des organes et à un mauvais pronostic (265). La microvascularisation comprend les vaisseaux d'un diamètre inférieur à 150-300 μm , tels que les petites artères, les artérioles, les capillaires et les veinules. Comme décrit en introduction, le calibre des vaisseaux rétiens n'excède pas 130 μm . C'est pourquoi nous avons choisi de travailler sur les cellules d'origine microvasculaire pour atteindre les objectifs de nos recherches concernant la toxicité des GCs (266).

Dans notre laboratoire, de part de notre spécificité thématique, de nombreux travaux concernant les GCs ont été réalisés sur les cellules endothéliales et les vaisseaux rétiens. Il nous a semblé intéressant de voir comment d'autres cellules microvasculaires réagissaient sous l'effet de ces substances chimiques, dans des conditions expérimentales similaires. Nous avons donc utilisé les cellules humaines de la microcirculation dermique (HMEC) en tant qu'élément comparatif.

Il est clair que faire une extrapolation de la toxicité constatée *in vitro* sur des cellules en culture à ce qui pourrait se passer *in vivo* est assez risqué. Nous avons donc besoin d'un modèle *in vivo* pour vérifier nos résultats *in vitro*.

Nous avons préféré le modèle *ex-vivo*, montage à plat de rétine de rat, d'une part parce qu'il nous permet d'apprécier directement l'ensemble du réseau vasculaire qui couvre la rétine, d'utiliser la microscopie conventionnelle et confocale autorisant l'emploi des marquages d'immuno-histochimiques. D'autre part, pour éviter l'injection intravitréenne (IVT) *in vivo* afin de mieux contrôler la quantité du traitement en contact direct avec les vaisseaux de la rétine. En effet, des études *in vivo* ont rapporté une baisse de la biodisponibilité dans le vitré et de la distribution à la surface de la rétine de la TA insoluble. Ceci est dû à la forte adhésion de la TA aux composants du vitré et à la formation d'agrégats qui sédimentent au fond du globe oculaire, induisant plus de toxicité dans la rétine périphérique que dans la rétine centrale (117, 126). Nous avons également souhaité éliminer les inconvénients de l'injection IVT, un geste invasif, pouvant biaiser les résultats de notre étude : par exemple l'inflammation associée à l'infection ou l'endommagement des tissus oculaires. Surtout qu'il a été montré que le seul fait d'introduire l'aiguille de seringue dans l'œil entraînait la sécrétion de facteurs protecteurs contre les lésions (267).

Néanmoins, nous sommes conscients que les modèles *in vivo* sont les plus représentatifs dans le cadre des évaluations toxicologiques des traitements car ils permettent d'éliminer très en amont de l'application clinique les molécules à toxicité rédhibitoire et ils sont adaptés aux études mécanistiques (la pharmacocinétique et la pharmacodynamique) permettant de mieux prévoir les effets indésirables qui pourraient être observés chez l'homme.

1.3 Les cellules endothéliales, ont-elles toutes la même sensibilité aux glucocorticoïdes ?

Au cours de ce travail, nous avons constaté que les BRECs sont moins sensibles aux traitements GCs que les HMEC. Plusieurs paramètres peuvent être à l'origine de cette résistance. Dans les conditions physiologiques normales le taux du cortisol libre est plus élevé dans l'œil que dans le sang circulant, grâce à la synthèse *in situ* par les cellules de l'épithélium pigmenté de la rétine et à l'absence des protéines de transport du cortisol CBG (101, 268). Ce qui rend, comme conséquence d'un phénomène d'adaptation, les cellules endothéliales de la rétine plus tolérantes aux GCs. En outre, comme décrit en introduction, l'endothélium de la rétine interne se caractérise par une grande stabilité (renouvellement lent ≈ tous les 25 ans), absence de fenestration et présence de jonctions serrées entre les cellules et donc une compacité qui lui confère une meilleure résistance (268-269).

1.4 Les GCs, exercent-ils la même toxicité sur les cellules ?

Vu que les différents corticoïdes sur lesquels nous avons travaillé sont des principes actifs appartenant à la même classe pharmaceutique, ils se lient aux mêmes récepteurs intracellulaires et ils ont les mêmes propriétés pharmacologiques, donc il est vraisemblable qu'ils aient une cytotoxicité plus ou moins équivalente. Nous avons constaté le contraire. Dès les premières observations, la morphologie des cellules et la baisse globale de la viabilité cellulaire sont variables, au sein d'une même population cellulaire, en fonction du GC employé. Les plus lipophiles sont les plus toxiques. Ceci s'expliquerait d'un côté, par le fait que la lipophilie des molécules augmente leur passage à travers les membranes cytoplasmiques et leur biodisponibilité dans les cellules. D'un autre côté, les GCs hydrophobes sont moins solubles et forment des cristaux qui exercent une cytotoxicité mécanique sur les cellules (270-271). En effet, il a été montré que la TA non soluble en contact direct avec les cellules de l'EPR *in vitro* induit une mort apoptotique pour certaines cellules, nécrotiques pour d'autres et quand les cristaux de la TA sont séparés des cellules par une membrane semi-perméable aucune mort cellulaire ne se produit (126).

1.5. Quelle est la réponse des cellules endothéliales au stress provoqué par les GCs ?

Une des façons d'évaluer les effets délétères d'un principe actif est de caractériser par quelle voie de signalisation il induit la mort. Très souvent on utilise des techniques visant la voie des caspases mais celle-ci, notre laboratoire l'a également démontré (121, 207, 272), n'est pas activé dans la totalité des situations. C'est pourquoi nous avons analysé différentes voies de mort cellulaire, en essayant de cibler les plus associées aux GCs et/ou aux cellules endothéliales.

Etant données les concentrations supraphysiologiques utilisées dans nos travaux, nous avons vérifié, dans un premier temps, la mort cellulaire par nécrose, déjà impliquée par d'autres cellules dans ce type de toxicité (126). Nous avons montré que seule la Dexa (0.1 mg/ml) est capable de provoquer une libération significative de lactate déshydrogénase, une enzyme intracellulaire libérée lors de la nécrose, dans les HMEC par rapport aux cellules non traitées (31.17%; **P≤0.01). De manière surprenante, la TA à la concentration de 0.1mg/ml, avec des propriétés physico-chimiques et biologiques semblables à la Dexa et qui, comme cette dernière forme également des cristaux insolubles, n'induit pas ce genre de mort, comme nous le commenterons plus tard.

Par la suite nous avons étudié la mort cellulaire par autophagie en cherchant l'apparition de ces marqueurs dans les HMECs. Notre contrôle positif de l'activation de l'autophagie a été fait en mettant les cellules en culture avec un milieu dépourvu d'acides aminés. Evidemment, ce type d'induction de l'autophagie correspond à une voie bien précise, celle dépendante de mTOR (149), qui n'est pas forcément celle activée dans nos cellules, mais notre but était uniquement d'induire l'apparition de vésicules autophagiques capables d'être marquées par LC3. En immunocytochimie, aucune vésicule autophagique n'a été détectée dans les cellules traitées par les GCs. L'ensemble de ces éléments témoignent de la non activation de l'autophagie dans notre modèle.

Plusieurs études incriminaient les GCs dans l'induction de stress oxydatif et de l'apoptose dans les cellules endothéliales (120-121, 124, 273-275). Cependant, les chercheurs évaluent souvent l'apoptose en analysant uniquement des marqueurs associés à la mort dépendante des caspases (Caspase 3 activée, un marquage TUNEL positif), ce qui exclut la cytotoxicité induite par l'activation d'autres voies de mort indépendantes des caspases comme celles induites par les DNase II (présentées en introduction). Par exemple, Hartnett et al ont montré que la TA à forte dose induit un changement de la morphologie et une baisse significative de la viabilité des cellules endothéliales de la rétine humaine (colorées au bleu trypan) (124). De façon un peu paradoxale (pour ceux qui considèrent que toute apoptose passe par l'activation des caspases), aucune activation de la caspase-3 n'a pu être décelée. Ce résultat suggère, à nos yeux, l'implication d'une voie différente dans le destin cellulaire et pas une absence de mort cellulaire ou un manque de toxicité. Pour ces raisons nous avons ciblé à la fois l'apoptose dépendante des caspases, marquée de façon générale par l'activation des caspases effectrices comme la caspase-3, et la mort cellulaire indépendante des caspases, notamment celles engageant la voie AIF et la LEI/L-DNase II, une endonucléase qui se transloque dans le noyau et dégrade l'ADN.

Pour étudier ce point nous avons, tout d'abord, essayé d'établir la condition apoptotique de ces cellules. Un des marqueurs de l'apoptose est la dégradation de l'ADN en oligonucléosomes comme expliqué précédemment (voir introduction chapitre I.3 La mort cellulaire). Nous avons exploré l'état de l'ADN génomique des HMECs par électrophorèse sur gel d'agarose qui révèle une nette fragmentation du matériel génomique dans les cellules traitées avec la Dexa et la Dexa-Ph. Cette fragmentation était moins marquée, mais néanmoins existante, dans les cellules exposées à la TA. Nous n'avons pas observé une dégradation de l'ADN dans les cellules traitées avec l'hydrocortisone.

Par la suite, les observations des immuno-marquages ont révélé la présence de la caspase-3 activée dans les cellules traitées avec la Dexa et la Dexa-Ph alors que la TA et l'Hydro montraient un marquage comparable au contrôle. Ce résultat est confirmé au niveau protéique par western blot. Notre contrôle positif pour l'activation de la caspase est obtenu par l'exposition des HMEC à l'Etoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II, utilisé en chimiothérapie et déclencheur classique de la voie des caspases (276). Dans l'optique de corroborer les résultats précédents, nous avons vérifié le clivage de la PARP, l'une des cibles intracellulaires de la caspase-3 activée. Au cours de l'apoptose, la PARP est clivée par les caspases effectrices -3 et -7 (277). La réparation de l'ADN est alors compromise et l'inactivation de la PARP permet également de préserver les stocks d'ATP qui sont nécessaires au déroulement de l'apoptose (278).

Le résultat obtenu concorde parfaitement avec ceux déjà trouvés puisque le western blot révèle la présence de la fraction clivée de cette protéine dans les cellules exposées à la Dexa et la Dexa-Ph uniquement. Il est intéressant de noter ici que les cellules étudiées sont parfaitement capables de déclencher la voie de caspases. Il ne s'agit pas là de cellules qui auraient un empêchement majeur, comme c'est le cas des MCF-7, par exemple, qui n'expriment pas la caspase 3 (145), mais de réponses différentes à des molécules pourtant similaires.

Etant donné l'absence d'activation des caspases avec certains GCs, nous avons regardé les voies alternatives de l'apoptose, les voies indépendantes des caspases. Nous en avons analysé deux : AIF et L-DNase II. Ce choix se base sur nos expériences précédentes (121). De ce fait, nous avons cherché la libération d'AIF de la mitochondrie et sa translocation nucléaire ainsi que l'activation de la LEI/L-DNase II, à travers sa translocation nucléaire à partir du cytoplasme.

AIF a montré un marquage cytoplasmique pointillé correspondant à sa localisation mitochondriale, aussi bien dans les cellules traitées que contrôle. De plus, l'analyse par Western Blot montre AIF sous sa forme clivée uniquement dans les cellules exposées à la Staurosporine (souvent employé comme inducteur de la voie AIF et que nous avons utilisé comme témoin positif). Aucun traitement GC n'a induit le relargage d'AIF dans le cytoplasme, indiquant que cette voie n'est pas activée dans nos conditions expérimentales.

Après avoir constaté que l'exposition des HMEC aux GCs n'active ni l'autophagie ni AIF, qu'elle déclenche la voie des caspases avec la Dexa et la Dexa-Ph et que seule la Dexa est

capable de provoquer la nécrose, nous constatons que la TA ne déclenche pas les mécanismes de mort classiques alors que sa toxicité sur les cellules a été largement démontrée. Nous avons donc exploré la voie de la LEI/L-DNase II (124, 258, 279-280) (281).

Nous résultats ont montré que cette voie est activée avec tous les glucocorticoïdes de notre étude. En effet, la translocation de la LEI dans le noyau a été révélée par un marquage immunocytochimique spécifique et par la présence dans le western blot de sa forme endonucléase clivée, L-DNase II (35kDa), dans la fraction nucléaire. L'activation de cette voie explique donc la mort des cellules traitées par la TA, car c'est la seule voie qui s'active dans ces conditions. Il est quand même intéressant de noter que la L-DNase II s'active dans tous les traitements. Ceci dit, il est fort possible que sa participation à la mort effective des cellules ne soit pas la même dans tous les cas. En effet, la voie de la LEI/L-DNase II est une voie assez lente, comparée à celle des caspases. De ce fait, s'il y a en même temps activation de la voie des caspases, il est fort possible que ce soit cette voie qui l'emporte, en termes d'efficacité pour conclure la mort de la cellule.

1.6 La réponse aux GCs varie-t-elle en fonction de l'origine de l'endothélium?

Pour vérifier si les observations faites sur les HMEC pouvaient l'être pour des cellules endothéliales d'origines distinctes *in vitro* comme *ex-vivo*, nous avons reproduit les expériences sur les BREC et les explants de rétines de rat Lewis albinos.

Les BREC ont reproduit les mêmes manifestations cellulaires avec les GCs que les HMEC. Effectivement, la voie des caspases est engagée avec La Dexa et la Dexa ph et l'ensemble des GCs déclenchent la voie LEI/L-DNase II. Bien que Valamanesh et al, aient montré une libération tardive d'AIF dans les BREC après 72h et 5jours de traitement par la 0.1mg/ml de TA, nous n'avons pas décelé l'activation de cette voie avec tous les GCs testés au court de nos expériences. Le délai relativement court de notre étude, comparé à celui de Valamanesh et al peut être à l'origine de la divergence des résultats. En effet, notre équipe a constaté, en utilisant d'autres modèles expérimentaux que si l'AIF et la L-DNase II sont activés dans la même cellule, la L-DNase II l'est en premier (201).

De la même façon que dans les HMEC, la Dexa et Dexa-Ph, induisent différentes voies de signalisation (caspase et L-DNaseII) qui agissent simultanément pour conduire à la mort des cellules. Ce résultat s'accorde avec d'autres études où l'activation de plusieurs mécanismes de mort était observée après exposition des cellules aux GCs (261, 282). En effet, certains xénobiotiques, dont les GCs font partie, induisent la production des espèces réactives de

l'oxygène ROS et NO qui activent différents mécanismes biochimiques aboutissant à l'activation simultanée de plus d'une voie de mort cellulaire (138, 283).

Les expériences mentionnées précédemment sont réalisées sur les cellules *in vitro*. Ces cellules ne représentent pas une structure vasculaire bien organisée dont les différents éléments (membrane basale, péricytes, par exemple) peuvent protéger les cellules ou modifier leur réponse aux toxiques. Nous avons donc investigué l'effet du contact direct des GCs sur les cellules endothéliales lorsqu'elles font partie des vaisseaux rétiniens. A cet effet, nous avons effectué des montages à plat des rétines et nous les avons exposées aux différents GCs. Nous avons identifié le réseau vasculaire dans ces préparations, que nous avons analysées par microscopie confocale, avec un anticorps dirigé contre le facteur de Von Willebrand (marqueur des cellules endothéliales). Nous avons noté dans les cellules endothéliales l'activation de la LEI /L-DNase II avec les quatre GCs coïncidant avec un marquage positif de la technique TUNEL, associée à un prétraitement par une phosphatase ce qui nous permet de voir les cassures 3'P induites dans l'ADN par l'action de la L-DNase II (annexe 2). De la même façon, les cellules de l'endothélium rétinien présentent une activation de la caspase-3, suite à l'exposition à la Dexa et la Dexa-ph. Ces résultats nous ont permis de conclure que les manifestations biologiques des cellules endothéliales suite aux traitements pas les GCs étaient les mêmes, *in vitro* et *ex vivo*. Les cellules endothéliales empruntent le même chemin vers la mort cellulaire, propre à chaque GC.

1. 7 La toxicité cellulaire est-elle médiée par les récepteurs stéroïdiens ?

Il nous a semblé primordial de voir si cette toxicité transitait ou pas par les récepteurs aux GCs.

Les résultats de l'évaluation de la viabilité cellulaire montrent que la toxicité observée ne passe pas par les récepteurs. A l'inverse, leur blocage s'avère délétère pour la fonction cellulaire suggérant leur rôle dans la physiologie de base des cellules, alors que dans d'autres modèles *in vitro* et *in vivo* (284) les effets secondaires des GCs étaient supprimés par le blocage pharmacologique de leurs récepteurs. Par exemple Zhao et al ont montré que le blocage des MRs chez le rat prévient contre la dilatation et la fuite des vaisseaux choroïdiens induites par des GCs (285).

Nos résultats écartent l'implication des récepteurs MRs et GRs dans les mécanismes toxiques constatés lors de nos expériences. En outre, l'activité des récepteurs étant saturée à des doses habituellement de l'ordre du nano molaire, il est plus probable qu'à forte dose, les

mécanismes de la mort passent par des voies non génomiques, plutôt que par des voies génomiques. De plus, l'action très précoce de la TA sur l'œdème rétinien (1 heure après injection intravitréenne) semble renforcer cette hypothèse (116).

2 Les limites de l'évaluation toxicologique des glucocorticoïdes

Notre recherche a porté sur l'étude des conséquences du traitement par GCs sur l'ADN, la survie des cellules et les voies de signalisations de la mort dans les cellules endothéliales. Les publications sur ces molécules mettent en avant leurs effets secondaires pléiotropes sur de nombreux modèles de cellule vasculaire, *in vitro et in vivo* (Tableau 3).

Le modèle cellulaire est indispensable dans l'étude de la morphologie, l'activité métabolique et des mécanismes moléculaires des cellules. Nos expériences sur les HMEC et les BREC montrent une corticotoxicité exprimée par l'activation de l'apoptose et la nécrose en fonction du GC utilisé. Ces deux types cellulaires permettent de prendre compte de l'hétérogénéité des phénomènes induits par les GCs. Toutefois, nous nous sommes interrogés sur leur pertinence quant à représenter les effets des GCs sur l'ensemble des cellules vasculaires susceptibles d'être en contact avec ces médicaments. Il est donc intéressant d'approfondir nos évaluations sur les cellules de la macrocirculation et la microcirculation provenant de différents tissus. Par exemple, explorer l'impact des GCs sur les cellules endothéliales cérébrales dont les caractéristiques anatomiques sont proches de notre modèle cellulaire de la rétine bovine. Cependant, comme il s'agit de cellules en culture avec une croissance en monocouche et des conditions d'incubation particulières (addition de sérum contenant des stéroïdes et des facteurs de croissance), elles peuvent montrer des résultats différents comparés à d'autres modèles (*in silico, ex-vivo, in vivo...ect.*). Par ailleurs, notre modèle d'étude peut être amélioré par la culture en 3D dans lesquelles les cellules prennent une disposition spatiale plus proche de celle qu'elles ont *in vivo*.

Il est également nécessaire de passer au modèle *in vivo*, par l'administration locale des GCs, afin de reproduire le microenvironnement cellulaire et explorer avec plus de précision la toxicité cellulaire et moléculaire, les atteintes structurelles et fonctionnelles, la cinétique du principe actif et sa clairance à l'issue d'une corticothérapie. Les résultats obtenus de ce genre d'étude complèteraient les expériences que nous avons menées *ex-vivo* sans les remplacer, en raison des éléments que nous avons déjà mentionnés.

Nos résultats de l'électrophorèse des extraits d'ADN sur gel d'agarose montrent une nette fragmentation de l'ADN dans les cellules traitées avec la Dexa et la Dexa-ph uniquement.

Cette technique permet de visualiser les fragments d'ADN de petites tailles (180-200 kDa) alors que les gros fragments (300 kDa) produits par d'autres endonucléases peuvent ne pas être révélés. Ce problème pourrait être résolu en faisant migrer les extraits d'ADN sur gel à champ pulsé qui grâce à son double champ électrique et sa migration non linéaire permet de mettre en évidence les gros fragments d'ADN(286).

3 L'évaluation de la toxicité des GCs sur l'endothélium vasculaire

Comme décrit en introduction, les GCs exercent leurs effets secondaires en agissant sur plusieurs paramètres en fonction de : leurs propriétés physicochimiques, la durée du traitement, la nature cellulaire et les doses utilisées. Il est vraisemblable que pour ces raisons, il n'existe pas une synthèse de l'ensemble des mécanismes de toxicité cellulaire provoquée par les GCs, surtout que plusieurs d'entre eux restent mal élucidés.

Les premières observations des effets vasculaires des GCs ont été rapportés lors du test de McKenzie (1962) (287), qui utilisait la vasoconstriction comme index d'absorption et d'occlusion, évaluée visuellement et quantitativement par le blanchissement de la peau, après 8 à 48 heures d'exposition à différents glucocorticoïdes en application topique. Parallèlement, l'effet des GCs sur la prolifération et la croissance des cellules endothéliales a été décrit par Folkman qui a montré que seule une faible dose de Dexaméthasone (la dose optimale de 0.2 µg /µl) pourrait induire la régression et empêcher la croissance de néovaisseaux dans la membrane chorioallantoïdienne aussi efficacement que l'hydrocortisone (dont l'efficacité était optimale à 5-6 µg /µl), tandis que de fortes doses (> 10 µg /µl) pourraient être toxiques. Ceci conduit à penser qu'au delà d'un certain seuil de concentration en médicament d'autres mécanismes peuvent expliquer la régression de la prolifération comme la mort des cellules endothéliales. De façon intéressante, les expériences de Folkman ont démontré que l'effet vasculaire des glucocorticoïdes n'est pas lié à leur activité anti-inflammatoire mais plutôt à leur effet sur la membrane basale des néovaisseaux (127, 288). Plus tard, intriguées par les propriétés angiostatiques ou antiangiogéniques des GCs, des équipes se sont intéressées à l'impact sur la matrice extracellulaire (métalloprotéinases) (122) et les molécules d'adhésion des cellules endothéliales (Tableau 3). Ceci dit, les résultats sont divergents et étroitement liés aux paramètres de chaque étude. Par exemple : Tatar et al ont étudié une série de 29 patients ayant subi un traitement par la photothérapie dynamique (PDT) plus la TA ou un traitement par la TA seule. Ils ont observé une augmentation de l'immuno marquage de l'ICAM-1 dans les cellules endothéliales et le stroma ainsi que la quantité totale de VEGF chez les patients traités par la TA. Ils ont conclu que la TA n'a pas d'effet inhibiteur sur l'infiltration macrophagique,

sur l'expression d'ICAM-1, de VEGF et que les intérêts cliniques d'une injection intravitréenne de TA ne sont probablement pas fondés sur des mécanismes purement anti-inflammatoires ou sur la suppression du VEGF (289). Lemaire et al, en menant une étude sur 32 volontaires sains ayant reçu une dose de 3-30mg de Prednisolone 2 heures avant de recevoir une injection d'endotoxine, ont montré une baisse de production des molécules d'adhésion s-ICAM, s-VCAM, sE-Selectine, qui étaient augmentés par l'endotoxine, avec un profil dose dépendant, suggérant le rôle suppresseur de la Prednisolone sur la réactivité et l'interaction des cellules endothéliales avec les cellules immunitaires (les macrophages) (290).

Initialement, il a été montré que l'effet vasculaire des stéroïdes était médié par l'inhibition des facteurs pro-angiogéniques spécialement le VEGF et les médiateurs pro-inflammatoires (les cytokines) (122, 291). Le VEGF est l'un des facteurs pro-angiogéniques le plus important sur lequel repose le développement et la croissance de la plupart des néovaisseaux oculaires, qu'ils soient rétinien ou choroïdien. Il est également supposé être le principal facteur amplificateur de la perméabilisation vasculaire à côté de l'histamine, l'IL-1, le TNF- α , l'IGF-1, le PDGF et le FGF (292-293). Toutefois, l'inhibition du VEGF à elle seule ne peut pas expliquer l'ensemble des mécanismes observés dans l'action antiproliférative des GCs. En effet, récemment les équipes de Logie et de Shikatani ont montré par des expériences réalisées *in vivo et in vitro* que le cortisol et la Dexaméthasone à des concentrations de l'ordre du nano molaire étaient responsables d'une série d'événements cellulaires qui convergent tous vers l'inhibition de la prolifération et de l'angiogénèse entre autres. Ils ont également mentionné que les GCs fragilisent les vaisseaux quiescents et altèrent le cytosquelette d'actine (80, 82) (Tableau 3).

Il est important de noter que souvent ces études étaient focalisées sur le rôle des GCs dans le processus angiogénique sans porter un quelconque intérêt à l'état des vaisseaux préexistants. De plus, elles étaient réalisées avec des faibles doses de stéroïdes, se rapprochant plus des concentrations plasmatiques du cortisol endogène que des doses utilisées en thérapeutique. En effet, en pratique clinique, les doses employées sont plus importantes. Tel est le cas en ophtalmologie.

L'atteinte de la perméabilité vasculaire a été constatée chez les patients souffrant d'une chorioretinopathie sévère centrale. Cette pathologie survient plus fréquemment chez des hommes jeunes, après un stress aigu ou une corticothérapie par voie générale ou locale. Elle se caractérise par un décollement de la neurorétine accompagné d'une accumulation de fluides dans les espaces subrétiniens (entre les photorécepteurs et l'EPR) et d'une vasodilatation des vaisseaux choroïdiens (294-295).

La pathogénèse de cette affection pourrait être due à une activation excessive du récepteur minéralocorticoïde (MR) par les GCs. Les traitements actuels visent à bloquer les MRs avec des agents pharmacologiques comme la spironolactone ou l'éplérénone (296).

Une étude clinique randomisée impliquant 69 yeux de 43 patients a décrit les changements vasculaires rétiens en réponse à une injection intravitréenne de TA chez des patients atteints d'œdème maculaire diabétique. Au cours des 3 mois de l'étude, il a été noté une réduction significative du diamètre des artérioles et veinules rétiennes des yeux traités démontrant un rôle vasoconstricteur de la TA sur les vaisseaux rétiens (297).

Des résultats semblables ont été obtenus par notre équipe. Dans l'optique d'évaluer l'impact des GCs, notamment la TA sur la double vascularisation rétinienne interne et externe, il a été mesuré sur coupe histologique *in vivo*, chez le rat, l'induction d'une vasoconstriction des vaisseaux superficiels reflétée par des changements de diamètre des vaisseaux rétiens. L'analyse des coupes histologiques semi-fines et des moulages choroïdiens a permis d'observer une réduction du diamètre des vaisseaux choroïdiens, un élargissement d'espaces inter-vasculaire et le rétrécissement de l'épaisseur choroïdienne (Tableau 3).

Plusieurs recherches ont été conduites dans le but d'établir un profil toxicologique de la TA dans l'œil. Malgré cela il y a des points de litige qui perdurent quant à la toxicité de la TA et/ou ses adjuvants sur les tissus oculaires. La cause principale : toutes ces études avaient en commun le manque d'expériences pour analyser la cytotoxicité et les mécanismes de mort cellulaire. (298-300).

Récemment, des travaux réalisés dans notre laboratoire ont permis d'obtenir quelques renseignements sur les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire par les GCs dans différents types cellulaires de la rétine. Ils ont montré qu'à très forte dose la TA induit la nécrose des différentes lignées cellulaires (ARPE-19, BRECs, cellules de Müller), qu'à plus faible dose le mécanisme de mort cellulaire semble varier selon le type cellulaire considéré. Ainsi, dans les cellules de l'épithélium pigmentaire il y a une mort vacuolaire apparentée à la paraptose, tandis que dans les BRECs le mécanisme est différent. Ils ont trouvé une translocation nucléaire de l'AIF et une activation de la L-DNase II matérialisée par une translocation nucléaire de la L-DNase II (121). Ces résultats s'accordent avec ceux obtenus dans cette étude.

Dans l'analyse de nos résultats nous avons établi une corrélation directe entre l'induction des différentes voies moléculaires qui aboutissent à l'activation des enzymes effectrices et

l'exécution de la mort dans les cellules. Les données bibliographiques ne démentent pas cette constatation. Toutefois, pour être formel dans l'implication d'une voie au lieu d'une autre, il serait indispensable de voir comment l'inhibition ou bien la surexpression des protéases effectrices des voies identifiées dans notre étude influencent la survie des cellules.

Domaine de recherche	Modèle expérimental	Principe actif, dose, temps de traitement	Les effets	Références
Propriétés anti-angiogéniques des glucocorticoïdes (GCs):	1) C E de la microcirculation utérine.	1) Cortisol, 0.01-1µM. 24hrs -7jours.	1) Inhibition du bourgeonnement des C E, formation tube vasculaire et transactivation de TPS1.	1) Rae.M et al.2009(301)
	2) C E de la veine ombilicale, C E aortique	2) cortisol, 300-1200nM et Dexamethasone 600nM, 22-24h.	2) Les GCs bloquent la formation de tube vasculaire par les C Es, fragilisent de vaisseaux pré-existants, altèrent le cytosquelette (F-actine), répriment la synthèse du VEGF, activent la transcription TPS1 (facteur antiangiogénique)	2) Logie. J et al. 2010(80)
	3) Modèle murin d'hémangiome infantile (Souris), C E progénitrice, C E du cordon ambulocale humain.	3) Dexamethasone, <i>in vivo</i> : 0.125-2 mg/kg, 7jours. <i>In vitro</i> : 0.2µM, 3 jours.	3) Inhibition de la vasculogénèse de la tumeur <i>in vivo</i> , transrépression des facteurs proangiogéniques : VEGF-A, MMP1.	3) Greenberger. S et al, 2010.(302)
	4) Modèle murin de mélanome (Souris C57BL/6)	4) Prédnisolone-phosphate, 20mg/kg (liposomes), 7jours	4) Réduction de la formation des NV, altération des marqueurs de l'intégrité vasculaire, limitation de la croissance tumorale	4) Kluza.E et al.2011.(303)
	5) Rats Sprague-Dawley, muscle squelettique du tibia, fragments capillaire de l'épididyme, C E de la microcirculation musculaire, C E du cordon ombilicale humain.	5) Hydrocortisone, <i>in vivo</i> : implant sous-cutané de 100mg [500 ng/ml], 14jours. <i>In vitro</i> : 600µM, 24-72 hrs.	5) Réduction des capillaires du muscle squelettique, des filaments d'actine, de la prolifération et migration des C E ↔répression de facteurs proangiogéniques VEGF, Sp1 et MMP-2. Transactivation du facteur angiostatique Fox-1. Absence d'apoptose et de nécrose.	5) Shikatani E.A et al.2012.(82)

	<p>Le pouvoir antiangiogénique des GCs a fait l'objet de nombreuses investigations, entres autres, le traitement des cancers (ex : prostate), les maladies cardiovasculaires, la fragilité osseuse, les menstruations massives, les néovaisseaux rétiens.</p>	<p>Yano. A et al, 2006(304), Folkman J et al 1985(305). Hadoke PWFet al 2009 (306). Weinstein RS et al 2010 (307). Rae.M et al.2009(301). Martidis. A. et al. 1999 (308).</p>
--	---	---

<p>Action des GCs sur les cellules endothéliales (CE)</p>	<p>1) C E de la veine ombilicale (HUVEC)</p> <p>2) C E de la veine ombilicale (HUVEC), C E dermique (HMEC-1).</p> <p>3) 32 Volontaires sains, mâles, âgés de 23ans.</p> <p>4) Cerveau de lapin prématuré P29. Cerveau humain de prématuré.</p>	<p>1) Dexamethasone, 50 et 500 ng/ml, 6 hrs.</p> <p>2) Dexamethasone, 1µM, 2-24 hrs.</p> <p>3) Prédnisolone 3-30mg par voie orale.une seule prise.</p> <p>4) Betamethasone, 0.2mg/kg et 12.5 mg/jours, 2jours. Dexamethasone : Prénatal, 6mg/jours, 2jours.</p>	<p>1) Réduction de l'expression de ICAM, E-Selectine. Aucun effet sur VCAM.</p> <p>2) Blocage de l'expression de ICAM dans les HUVEC et HMEC-1. Inhibition de l'expression VCAM et E-Selectine les HUVEC</p> <p>3) Inhibition de production des molécules d'adhésions : s-ICAM, s-VCAM, sE Selectine.</p> <p>4) Diminution de la prolifération des C E, inhibition du VEGF et une discontinuité dans l'arabe vasculaire cérébral, réduction de la densité des NV.</p>	<p>1) Aziz et Wakefield.1995 (309)</p> <p>2) Chen et al.2002 (70).</p> <p>3) Lemaire.C et al.2008 (290).</p> <p>4) Vinukonda.G et al.2010 (310)</p>
<p>Toxicité des GCs : La rétine et ses vaisseaux.</p>	<p>1) <i>In vitro</i> : C E de la rétine bovine (BREC)</p> <p><i>In vivo</i> : Modèle murin de rétinopathie chez le prématuré (souris C57BL/6).</p>	<p>1) <i>In vitro</i> : TA, 0.05-8 mg/ml , 48-60 hrs</p> <p><i>In vivo</i> : TA, 40µg IVT. 5 jours.</p>	<p>1) Effet cytotoxique et antiprolifératif les BREC La TA supprime 58% des NV rétiens <i>in vivo</i>.</p>	<p>1) Spandau U.H.M et al. 2005(258)</p>

	<p>2) In vitro : C E de rétine Humaine. In vivo : Modèle de rétinopathie chez le rat</p> <p>3) Modèle de NV choroïdienne par impact laser chez les souris C57BL/6.</p> <p>4) Modèle murin de rétinopathie chez le prématuré (souris C57BL/6).</p> <p>5) Membrane chorioallantoïque de l'embryon de caille.</p> <p>6) In vitro C E de la rétine bovine (BREC). In vivo : rat Lewis. Coupe semi-fine de la Choriorétine et Moulage de la choriocapillaire.</p>	<p>2) In vitro: TA, 20-2000µg/ml, 24 hrs. In vivo : TA, 0.4-4mg/ml, Dexamethasone, 0.3mg/ml, IVT, 4jours.</p> <p>3) T A. 1.5-30µg (IVT). 1-120 jours.</p> <p>4) TA. 20 et 40µg IVT. 5 jours.</p> <p>5) TA, 0-16ng/ml, 24-48 hrs</p> <p>6) In vitro : TA 0.1 mg/ml et 1 mg/ml. 24 h ,72 h, 5 jours (BREC). In vivo: TA, 15 µg, 40µg en IVT, 30jours.</p>	<p>2) In vitro: Effet cytotoxique dépendante sur les C E. Mort cellulaire avec caspase-3 négatif. In vivo : régression des NV et de la densité des capillaires. La Dexa est inefficace sur l'angiogénèse</p> <p>3) Inhibition de la NV. Présence de cellules apoptotiques dans la couche nucléaire externe de la rétine.</p> <p>4) Régression nombre des cellules endothéliales à la surface de la membrane limitante interne de la rétine.</p> <p>5) Blocage de la formation des petites vaisseaux, réduction de la densité vasculaire, diminution du diamètre des gros vaisseaux de l'arbre vasculaire (dose dépendante).</p> <p>6) In vitro : Baisse de la viabilité cellulaire. Activation AIF et LEI/L-DNase II. In vivo : Diminution du diamètre vaisseaux rétinien et choroïdiens, amincissement de la couche choroïdienne, et augmentation de l'espace perivasculaire. La TA (15µg) induit l'activation la LEI-L-DNase II dans les NV.</p>	<p>2) Hartnett. E et al.2006(124)</p> <p>3) Dot. C et al.2007(311).</p> <p>4) Akkoyun.I et al.2007.</p> <p>5) McKay T.L et al 2008(312).</p> <p>6)Valamanesh. F et al.2009(121). Torriglia. A et al 2010 (120). Behar-Cohen. F 2011(313)</p>
--	--	---	--	--

C E : Cellule endothéliale. **TA** : Triamcinolone Acétonide. **Dexa** : Dexamethasone. **IVT** : Injection intravitréenne. Néovaisseaux : NV.

Tableau 3 : Liste non exhaustive des études évaluant les effets des glucocorticoïdes sur les cellules endothéliales et les vaisseaux *in vitro* et *in vivo*.

En somme, nous avons montré que les GCs exercent une toxicité dose-dépendante et cortico-spécifique sur chacune des populations cellulaires étudiées. Nous avons aussi constaté que la fragilité des cellules endothéliales était due à leurs propriétés anatomiques, les cellules endothéliales rétinienne étant plus résistantes que celles de la circulation générale. Enfin nous avons montré que cette toxicité passe par l'activation d'un ou plusieurs types de mort cellulaire simultanément.

Les effets secondaires des GCs sur les cellules sont encore loin d'être élucidés et l'ensemble des résultats présentés montre qu'il est encore nécessaire :

-De déterminer l'impact des GCs sur les cellules avec une cinétique de traitement prolongée, ce qui permettrait de déterminer les réactions cellulaires manquées par le temps d'exposition relativement réduit de notre étude. Par exemple : l'activation de l'autophagie connue pour être un processus lent (140) ou bien la voie d'AIF, non induite dans notre étude mais activée dans une autre dans laquelle un temps d'exposition supérieur était le seul point de discordance expérimentale (121).

-D'étudier avec plus de détail les acteurs de la voie des caspases. En effet, il serait intéressant de savoir si les GCs activent les caspases le font par voie intrinsèque via la mitochondrie (libération du Cyt-c) ou extrinsèque à travers les récepteurs membranaires (activation caspase-8 ce qui expliquerait la nécrose et l'activation de la caspase-3 dans notre étude (138) ou bien les deux ensembles.

4 Inflammation oculaire : XG-102 futur candidat médicament

Vu l'ampleur des effets secondaires de l'action multiple des GCs, des thérapies ciblées sont en plein essor dans le cadre d'innovation dans le traitement des pathologies inflammatoires. Dans cette optique nous avons évalué l'efficacité de XG-102 dans le traitement de l'inflammation intraoculaire dans un modèle d'uvéite chez le rat Lewis albinos.

L'uvéite antérieure aiguë est une maladie inflammatoire récidivante de l'œil chez l'Homme dont l'évolution peut conduire à la perte de la vision.

En clinique, les uvéites non infectieuses aiguës, chroniques, récidivantes ou progressives sont traitées par l'administration locale (topique) ou systémique de corticostéroïdes. Parallèlement aux effets bénéfiques des GCs, de nombreux effets délétères apparaissent, tels que l'augmentation de la pression intraoculaire, l'apparition de cataracte, le développement d'infections opportunistes et la toxicité sur la rétine. De plus, en cas de chronicité, des effets secondaires systémiques sont également observés. Le recours à d'autres traitements palliatifs

tels que le Méthotrexate, des agents immunosuppresseurs tels que la Ciclosporine ont aussi montré un bénéfice clinique mais qui n'est pas dépourvu d'effets secondaires importants. Compte tenu des effets indésirables de ces traitements, il y a une demande évidente pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques alternatives en ophtalmologie.

Les résultats inclus dans la seconde partie de ma thèse ont confirmé l'efficacité thérapeutique de l'administration locale de XG-102 (Molécule à visée anti-inflammatoire) et vérifié sa valeur curative dans une nouvelle voie d'administration par injection sous-conjonctivale, dans le but de réduire l'inflammation engendrée par l'uvéite aiguë induite par le lipopolysaccharides (LPS) chez les rats.

4.1 Choix du modèle d'étude

L'EIU (Endotoxin-induced uveitis) chez le rat est un modèle animal utile pour l'étude de l'uvéite antérieure humaine (314). Dans ce modèle, l'administration de lipopolysaccharides (LPS) dans le coussinet plantaire entraîne une réponse inflammatoire aiguë dans le segment antérieur et postérieur de l'œil avec une rupture de la barrière hémato-rétinienne et une infiltration de cellules inflammatoires. Les signes cliniques d'EIU reflètent les changements observés dans la maladie humaine : poussée des protéines caractéristiques de la maladie et des cellules dans l'humeur aqueuse, myosis et synéchie (adhérence morbide de l'iris avec les tissus voisins) (315).

4.2 Le choix de la molécule thérapeutique

Le choix de XG-102 comme molécule anti-inflammatoire se justifie par son pouvoir d'inhiber sélectivement JNK, une kinase dont l'activation induit sa migration dans le noyau où elle lie et phosphoryle le c-Jun, un facteur de transcription, sur les serines 63 et 73, placées dans son domaine d'activation transcriptionnelle qui, une fois activé, initie la transcription de la plupart des facteurs inflammatoires (les cytokines (IL1, CINC-1...etc.), iNOS,) (316). XG-102 a montré aussi sa stabilité (sa demi-vie longue) dans les milieux biologiques, sa capacité de traverser la membrane cytoplasmique, ce qui lui confère une grande biodisponibilité. Il a également révélé une bonne tolérance dans les différents tissus de l'organisme (317). De plus, les inhibiteurs de JNK ont montré leur efficacité dans les modèles divers d'inflammation (84-85) et pourraient donc être une alternative intéressante aux traitements par les glucocorticoïdes dans l'uvéite.

Notre laboratoire a conduit la première étude d'exploration de XG-102 dans l'œil dans laquelle il a été montré que : XG-102 administré par voie intraveineuse (IV) ou injection intravitréenne (IVT) a une bonne distribution cellulaire. De plus il est bien toléré par les tissus oculaires vu qu'aucune réaction de rejet n'a été décelée dans les yeux injectés avec le produit. Il a aussi efficacement inhibé l'inflammation intraoculaire dans notre modèle d'EIU apportant la preuve que l'inhibition spécifique de JNK pourrait avoir un potentiel thérapeutique dans le traitement d'uvéites (318).

Dans la perspective d'une application clinique, d'autres voies d'administration moins traumatisantes pourraient être plus appropriées. Vu que JNK est une kinase ubiquitaire l'administration locale est la plus judicieuse lorsque l'œil est le seul organe concerné par l'inflammation. Dans ce cadre, la voie sous-conjonctivale (SCJ) semble être particulièrement intéressante. D'une part, cette voie est très peu invasive et présente peu de risque d'infection. D'autre part, des études ont montré que l'administration SCJ pourrait permettre la diffusion de molécules jusqu'à 150 kDa (le XG-102 fait 2.2 KDa) dans les liquides oculaires via la sclère (319).

Nous avons évalué les effets thérapeutiques dépendants des doses de XG-102 sur EIU chez les rats, utilisant différentes voies d'administrations : IV, IVT ou SCJ.

4.3 Analyses de résultats, limites et perspectives

Dans notre étude, nous avons montré que XG-102 avait une activité anti-inflammatoire dose-dépendante par voie SCJ et IV comparable à celle des glucocorticoïdes (Dexaméthasone-Phosphate) à des concentrations élevées. L'efficacité anti-inflammatoire de XG-102 par voie intravitréenne était significative et comparable à celle des glucocorticoïdes mais, étonnamment, l'augmentation de la dose n'influence pas le pouvoir thérapeutique. Nous avons suggéré que pour les injections IVT les faibles doses soient d'emblée utilisées, car suffisantes pour obtenir un effet optimal.

Pour l'administration SCJ et IV, nous avons constaté que les doses moyennes de XG-102 respectivement 1,8µg et 35µg, étaient significativement efficaces sur le score clinique de la pathologie; l'activité anti-inflammatoire a été vérifiée par le blocage de l'infiltration intraoculaire des cellules inflammatoires (PMN) et l'expression d'iNOS et CINC-1(cytokine chemoattractante des PMN). En outre, la phosphorylation de c-Jun a été nettement diminuée dans les mêmes conditions expérimentales indiquant la spécificité du mécanisme d'action de ce traitement. Par IVT, XG-102 a montré la même efficacité sur les différents paramètres de

l'EIU explorés dans notre étude et ce dès la plus faible dose testée. L'ensemble de ces résultats nous a permis de confirmer le pouvoir anti-inflammatoire de l'interaction de XG-102 avec la voie JNK.

A notre connaissance c'est la première étude qui évalue les propriétés thérapeutiques de ce peptide par voie sous conjonctivale qui se présente comme la voie optimale pour l'administration de XG-102 dans le traitement des états inflammatoires intraoculaires.

Nous sommes conscients que de part la petite taille des échantillons, il est difficile de comparer les différentes voies d'administration et de certifier le pouvoir thérapeutique de la molécule testée dans notre modèle. Afin de prouver l'efficacité et la sécurité d'utilisation de XG-102 d'autres études complémentaires sont à prévoir incluant un nombre plus élevé d'animaux.

5 Apport de ce Travail

Depuis que les GCs ont révélé leur pouvoir inhibiteur dans la prolifération des cellules endothéliales, de nombreux travaux ont été menés dans l'espoir de déchiffrer les mécanismes impliqués dans ce phénomène au niveau de la cellule comme sur les structures vasculaires. Bien souvent la toxicité observée était liée aux effets antiprolifératifs sans preuve qui puisse exclure l'existence de mécanismes cytotoxiques, soit par manque d'investigation sur les voies de signalisation soit à défaut d'outils adéquats d'évaluation.

De plus, la diversité des actions des GCs, de leurs propriétés pharmaco-chimiques, des conditions d'expérimentation, rend très difficile la comparaison des différentes études visant à élucider les mécanismes de leurs effets secondaires.

A notre connaissance c'est la première fois qu'une telle comparaison est faite. Un travail qui explore les effets sous-jacents d'une exposition aiguë, à différents GCs sur les cellules endothéliales.

Nous avons montré que les GCs ont une réelle cytotoxicité qui s'exprime par l'activation de différentes voies de la mort cellulaire à la fois dépendantes et indépendantes des caspases. En outre, nous avons observé une co-activation de plus d'une voie de mort cellulaire avec certains GCs suggérant l'existence de plusieurs cibles cellulaires de ces principes actifs et/ou l'interaction entre les multiples acteurs des voies de mort.

Dans le cadre de cette évaluation, nous avons constaté que la Dexaméthasone-phosphate hydrophile était le meilleur traitement en terme de tolérance. Etant données ses propriétés pharmacologiques équivalentes aux autres traitements, elle se présente comme un choix

ingénieux pour l'équilibre bénéfice/risque. D'une part, ses effets secondaires n'ont été observés qu'à très fortes doses, dix fois supérieures par rapport aux autres principes actifs, d'autre part, sa solubilité lui confère l'avantage d'épargner aux cellules le stress cytotoxique consécutif à la formation d'agrégats ou des cristaux comme c'est le cas pour la TA et la Dexa. Parallèlement, notre idée rejoint les conclusions d'Ashish et al, qui en comparant le passage et la bio-distribution de six GCs de coefficient de lipophilicité différents, ont démontré qu'après une administration trans-sclérale, les GCs hydrophiles avaient une meilleure répartition sur la surface de la rétine et une plus forte concentration dans le vitrée comparé aux GCs plus lipophiles, à cause de la mélanine des pigments de l'EPR affine aux molécules lipophiles (320).

-Finalement notre travail tire son originalité du fait que nous avons évalué les effets des GCs sur les vaisseaux sains qui représentent, en pratique, les tissus préexistants souvent négligés dans le protocole thérapeutique.

Dans le cadre de l'innovation thérapeutique, nous avons évalué l'effet dose-réponse de XG-102, par l'administration par diverses voies, dans le traitement de l'uvéite induite par une endotoxine (EIU) chez le rat Lewis Albinos. Les résultats de ce travail ont confirmé l'efficacité de ce traitement dans l'inhibition du développement de l'inflammation intraoculaire par son action ciblée sur les molécules médiatrices des pathologies.

Récemment, la première étude clinique pilote évaluant l'effet anti-inflammatoire de l'injection sous-conjonctivale de XG-102 a été menée en milieu hospitalier. En effet, un essai clinique de phase Ib (numéro EudraCT: 2011-000171-14) a été effectué pour évaluer l'innocuité et la tolérance de XG-102 injecté en sous-conjonctivale. Les résultats ont démontré une très bonne tolérance.

Par nos recherches, nous avons essayé d'apporter des informations complémentaires à celles déjà obtenues et de mettre une petite pierre à l'édifice de la compréhension des mécanismes de la toxicité observée avec les glucocorticoïdes. Nous espérons, avec ces nouvelles données, mettre en garde sur les répercussions néfastes de l'utilisation excessive, de fortes doses souvent non justifiées, sur les tissus vasculaires que ce soit en ophtalmologie, notre domaine de recherche, ou de façon générale dans toutes les disciplines médicales.

6 Les perspectives

Nos expériences sur l'implication de la mort cellulaire dans le mécanisme de toxicité induit par les glucocorticoïdes (GCs) sur les cellules endothéliales sont incomplètes mais elles débouchent sur des perspectives fondamentales et cliniques intéressantes.

A l'issue de nos observations et analyses, une question fondamentale à savoir comment les GCs déclenchaient l'apoptose dans les cellules endothéliales demeurait sans réponse. Les premiers soupçons sur l'éventuelle implication de leurs récepteurs dans le mécanisme de la toxicité, étaient très vite écartés lorsque nous avons observé que les antagonistes des RGs et RMs n'avaient pas une action protectrice sur la survie des cellules. Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que les GCs altéraient les cellules par une action directe récepteur-indépendante. Nous avons été encouragé par les résultats des études récentes qui ont montré que les stéroïdes à des concentrations micromolaires étaient capables de se lier aux phospholipides et protéines cytoplasmiques, de moduler l'organisation de la membrane cellulaire et d'activer des canaux voltage-dépendants sans l'intervention d'aucun récepteur, uniquement par une simple modification des propriétés physicochimiques de la membrane (53-54, 321). Il nous a semblé intéressant de vérifier cette hypothèse par l'analyse structurale de la membrane plasmique, notamment l'assemblage des protéiques membranaires après des traitements précoces (en amont des temps de réponse dépendant des récepteurs) sur les cellules.

Afin de compléter nos résultats sur les vaisseaux réiniens, il nous semble nécessaire de réaliser d'autres expériences visant à explorer la toxicité des GCs sur les vaisseaux *in vivo* : comme de quantifier la mort des cellules vasculaires consécutive à l'administration locale de chacun des traitements GCs, vérifier si les cellules apoptotiques sont remplacées dans les vaisseaux, et si oui quel est le délai de la régénérescence. Enfin, vérifier l'étanchéité des vaisseaux après les différents traitements par exploration fonctionnelle (Angiographie).

Afin de contrer les conséquences nocives de l'action pléiotrope des GCs, il serait nécessaire d'établir des stratégies thérapeutiques plus ciblées dans le traitement de l'inflammation. Les résultats de l'évaluation préclinique des inhibiteurs spécifiques de JNK sont prometteurs pour leur future utilisation dans le traitement de l'inflammation intraoculaire. A notre connaissance les premiers résultats des essais cliniques sur l'administration sous-conjonctivale de XG-102 révèlent une bonne tolérance sur les tissus oculaires.

Chapitre IV : Conclusion

Les glucocorticoïdes (GCs) présentent un intérêt majeur dans le traitement de nombreuses pathologies. Des travaux antérieurs ont montré une toxicité des GCs sur les cellules gliales et de l'épithélium pigmentaire de la rétine par l'activation de mécanismes non classiques de mort cellulaire.

Dans ce travail, nous avons cherché à évaluer les effets des GCs sur les structures microvasculaires de la rétine. Pour ce faire, quatre GCs aux propriétés physicochimiques distinctes ont été testés sur des cellules endothéliales de la rétine bovine, les cellules endothéliales humaines de la microcirculation dermique et les microvaisseaux de la rétine interne. Nous montrons que la sensibilité des cellules est fonction du type cellulaire et du GC testé. Les cellules endothéliales du derme sont les plus vulnérables et les GCs les plus hydrophobes sont les plus toxiques. L'étude des voies de mort cellulaire montre une activation de la caspase-3 avec la Dexaméthasone et la Dexaméthasone-Phosphate. Tous les GCs employés dans notre étude déclenchent la voie de la LEI/L-DNase II, une voie indépendante des caspases.

Nous avons également montré que l'inhibiteur spécifique de la voie JNK XG-102, un candidat à la substitution des GCs, est efficace sur l'uvéite induite par l'endotoxine chez le rat, par la réduction du nombre des polynucléaires neutrophiles infiltrés dans le foyer inflammatoire, par la baisse de l'expression de l'iNOS et de la chemokine CINC-1 ainsi que par l'inhibition de la phosphorylation de la protéine c-Jun dans la neurorétine.

Ces données nous permettront, à terme, une meilleure compréhension et manipulation clinique de ces médicaments anti-inflammatoires dont l'utilité est démontrée depuis plusieurs décennies.

Bibliographie

1. Xing, Y., Parker, C. R., Edwards, M., and Rainey, W. E. (2010) ACTH is a potent regulator of gene expression in human adrenal cells, *J Mol Endocrinol* 45, 59-68.
2. Young, F. G. (1951) Thomas Addison and the background to cortisone, *Br Med J* 2, 1535-1541.
3. Hench, P. S., Kendall, E. C., Slocumb, C. H., and Polley, H. F. (1950) Cortisone, its effects on rheumatoid arthritis, rheumatic fever, and certain other conditions, *Merck Rep* 59, 9-14.
4. Chast, F. (2013) [History of corticotherapy], *Rev Med Interne* 34, 258-263.
5. Chast, F. (2002) *Histoire contemporaine des médicaments*, Paris.
6. Voutilainen, R., Tapanainen, J., Chung, B. C., Matteson, K. J., and Miller, W. L. (1986) Hormonal regulation of P450_{scc} (20,22-desmolase) and P450_{c17} (17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase) in cultured human granulosa cells, *J Clin Endocrinol Metab* 63, 202-207.
7. Zhao, M., Valamanesh, F., Celerier, I., Savoldelli, M., Jonet, L., Jeanny, J. C., Jaisser, F., Farman, N., and Behar-Cohen, F. (2010) The neuroretina is a novel mineralocorticoid target: aldosterone up-regulates ion and water channels in Muller glial cells, *FASEB J* 24, 3405-3415.
8. Rivest, S. (2001) How circulating cytokines trigger the neural circuits that control the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, *Psychoneuroendocrinology* 26, 761-788.
9. Webster, J. I., Tonelli, L., and Sternberg, E. M. (2002) Neuroendocrine regulation of immunity, *Annu Rev Immunol* 20, 125-163.
10. Slavinski, E. A., Jull, J. W., and Auersperg, N. (1976) Steroidogenic pathways and trophic response to adrenocorticotrophin of cultured adrenocortical cells in different states of differentiation, *J Endocrinol* 69, 385-394.
11. Stocco, D. M. (2001) StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis, *Annu Rev Physiol* 63, 193-213.
12. Chrousos, G. P. (1995) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation, *N Engl J Med* 332, 1351-1362.
13. Jezova, D., Ochedalski, T., Kiss, A., and Aguilera, G. (1998) Brain angiotensin II modulates sympathoadrenal and hypothalamic pituitary adrenocortical activation during stress, *J Neuroendocrinol* 10, 67-72.

14. Keller-Wood, M. E., and Dallman, M. F. (1984) Corticosteroid inhibition of ACTH secretion, *Endocr Rev* 5, 1-24.
15. Walker, J. J., Spiga, F., Waite, E., Zhao, Z., Kershaw, Y., Terry, J. R., and Lightman, S. L. (2012) The origin of glucocorticoid hormone oscillations, *PLoS Biol* 10, e1001341.
16. Breuner, C. W., and Orchinik, M. (2002) Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates, *J Endocrinol* 175, 99-112.
17. Schacke, H., Docke, W. D., and Asadullah, K. (2002) Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids, *Pharmacol Ther* 96, 23-43.
18. Mendel, C. M. (1989) The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model, *Endocr Rev* 10, 232-274.
19. Roumestan, C., Gougat, C., Jaffuel, D., and Mathieu, M. (2004) [Glucocorticoids and their receptor: mechanisms of action and clinical implications], *Rev Med Interne* 25, 636-647.
20. Hammond, G. L., Smith, C. L., Paterson, N. A., and Sibbald, W. J. (1990) A role for corticosteroid-binding globulin in delivery of cortisol to activated neutrophils, *J Clin Endocrinol Metab* 71, 34-39.
21. Le Jeune, C. (2012) Pharmacologie des glucocorticoïdes, *La Presse Médicale* 41, 370-377.
22. Cohen, Y., and Jacquot, C. (1981) *Pharmacologie.Médicaments anti-inflammatoires* Paris.
23. O'Malley, B. W., and Means, A. R. (1976) The mechanism of steroid-hormone regulation of transcription of specific eukaryotic genes, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 19, 403-419.
24. Dejean, C., and Richard, D. (2013) [Mechanisms of action of glucocorticoids], *Rev Med Interne* 34, 264-268.
25. Rhen, T., and Cidlowski, J. A. (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs, *N Engl J Med* 353, 1711-1723.
26. De Iudicibus, S., Franca, R., Martellosi, S., Ventura, A., and Decorti, G. (2011) Molecular mechanism of glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease, *World J Gastroenterol* 17, 1095-1108.
27. Dahlman-Wright, K., Almlöf, T., McEwan, I. J., Gustafsson, J. A., and Wright, A. P. (1994) Delineation of a small region within the major transactivation domain of the

- human glucocorticoid receptor that mediates transactivation of gene expression, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1619-1623.
28. Danielsen, M., Hinck, L., and Ringold, G. M. (1989) Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response element activation by the glucocorticoid receptor, *Cell* 57, 1131-1138.
 29. Nicolaides, N. C., Galata, Z., Kino, T., Chrousos, G. P., and Charmandari, E. (2010) The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function, *Steroids* 75, 1-12.
 30. Arriza, J. L., Weinberger, C., Cerelli, G., Glaser, T. M., Handelin, B. L., Housman, D. E., and Evans, R. M. (1987) Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor, *Science* 237, 268-275.
 31. Farman, N., and Bocchi, B. (2000) Mineralocorticoid selectivity: molecular and cellular aspects, *Kidney Int* 57, 1364-1369.
 32. Yang, S., and Zhang, L. (2004) Glucocorticoids and vascular reactivity, *Curr Vasc Pharmacol* 2, 1-12.
 33. Odermatt, A., and Atanasov, A. G. (2009) Mineralocorticoid receptors: emerging complexity and functional diversity, *Steroids* 74, 163-171.
 34. Dong, Y., Poellinger, L., Gustafsson, J. A., and Okret, S. (1988) Regulation of glucocorticoid receptor expression: evidence for transcriptional and posttranslational mechanisms, *Mol Endocrinol* 2, 1256-1264.
 35. Vandevyver, S., Dejager, L., and Libert, C. (2012) On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back, *Traffic* 13, 364-374.
 36. Vandevyver, S., Dejager, L., Tuckermann, J., and Libert, C. (2013) New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation, *Endocrinology* 154, 993-1007.
 37. Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R., and Sigler, P. B. (1991) Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA, *Nature* 352, 497-505.
 38. Datson, N. A., Morsink, M. C., Meijer, O. C., and de Kloet, E. R. (2008) Central corticosteroid actions: Search for gene targets, *Eur J Pharmacol* 583, 272-289.
 39. Lu, N. Z., and Cidlowski, J. A. (2006) Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity, *Trends Cell Biol* 16, 301-307.

40. De Kloet, E. R., and Reul, J. M. (1987) Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems, *Psychoneuroendocrinology* 12, 83-105.
41. Trapp, T., and Holsboer, F. (1996) Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptors increases the functional diversity of corticosteroid action, *Trends Pharmacol Sci* 17, 145-149.
42. Datson, N. A., van der Perk, J., de Kloet, E. R., and Vreugdenhil, E. (2001) Identification of corticosteroid-responsive genes in rat hippocampus using serial analysis of gene expression, *Eur J Neurosci* 14, 675-689.
43. Drouin, J. (1993) *Repression of transcription by nuclear receptor* London.
44. Cato, A. C., Nestl, A., and Mink, S. (2002) Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways, *Sci STKE* 2002, re9.
45. Ray, A., and Prefontaine, K. E. (1994) Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 752-756.
46. De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2003) The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression, *Endocr Rev* 24, 488-522.
47. Tanabe, T., and Tohnai, N. (2002) Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, 95-114.
48. Matthews, L., Berry, A., Ohanian, V., Ohanian, J., Garside, H., and Ray, D. (2008) Caveolin mediates rapid glucocorticoid effects and couples glucocorticoid action to the antiproliferative program, *Mol Endocrinol* 22, 1320-1330.
49. Grossmann, C., Husse, B., Mildenerger, S., Schreier, B., Schuman, K., and Gekle, M. (2010) Colocalization of mineralocorticoid and EGF receptor at the plasma membrane, *Biochim Biophys Acta* 1803, 584-590.
50. Groeneweg, F. L., Karst, H., de Kloet, E. R., and Joels, M. (2011) Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response, *J Endocrinol* 209, 153-167.
51. Strehl, C., Gaber, T., Lowenberg, M., Hommes, D. W., Verhaar, A. P., Schellmann, S., Hahne, M., Fangradt, M., Wagegg, M., Hoff, P., Scheffold, A., Spies, C. M., Burmester, G. R., and Buttgerit, F. (2011) Origin and functional activity of the membrane-bound glucocorticoid receptor, *Arthritis Rheum* 63, 3779-3788.

52. Stellato, C. (2012) Posttranscriptional Gene Regulation: Novel Pathways for Glucocorticoids' Anti-inflammatory Action, *Transl Med UniSa* 3, 67-73.
53. Falkenstein, E., Tillmann, H. C., Christ, M., Feuring, M., and Wehling, M. (2000) Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects, *Pharmacol Rev* 52, 513-556.
54. Bailey, R. W., Nguyen, T., Robertson, L., Gibbons, E., Nelson, J., Christensen, R. E., Bell, J. P., Judd, A. M., and Bell, J. D. (2009) Sequence of physical changes to the cell membrane during glucocorticoid-induced apoptosis in S49 lymphoma cells, *Biophys J* 96, 2709-2718.
55. McMaster, A., and Ray, D. W. (2007) Modelling the glucocorticoid receptor and producing therapeutic agents with anti-inflammatory effects but reduced side-effects, *Exp Physiol* 92, 299-309.
56. Fowden, A. L., and Forhead, A. J. (2004) Endocrine mechanisms of intrauterine programming, *Reproduction* 127, 515-526.
57. Khulan, B., and Drake, A. J. (2012) Glucocorticoids as mediators of developmental programming effects, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 26, 689-700.
58. Fowden, A. L. (1995) Endocrine regulation of fetal growth, *Reprod Fertil Dev* 7, 351-363.
59. Gagliardi, L., and Le Jeune, C. (2012) Corticothérapie et diabète, *La Presse Médicale* 41, 393-399.
60. Valtat, B., Riveline, J. P., Zhang, P., Singh-Estivalet, A., Armanet, M., Venteclef, N., Besseiche, A., Kelly, D. P., Tronche, F., Ferre, P., Gautier, J. F., Breant, B., and Blondeau, B. (2013) Fetal PGC-1alpha overexpression programs adult pancreatic beta-cell dysfunction, *Diabetes* 62, 1206-1216.
61. Tappy, L. (2006) Réponses neuroendocriniennes au stress et maladies métaboliques, *Nutrition clinique et métabolisme* 20, 95-98.
62. Mitch, W. E. (2000) Mechanisms accelerating muscle atrophy in catabolic diseases, *Trans Am Clin Climatol Assoc* 111, 258-269; discussion 269-270.
63. Leal-Cerro, A., Soto, A., Martinez, M. A., Dieguez, C., and Casanueva, F. F. (2001) Influence of cortisol status on leptin secretion, *Pituitary* 4, 111-116.
64. Lombes, M. (2009) Various actions of aldosterone: the kidney and beyond, *Ann Endocrinol (Paris)* 70, 173-175.
65. Richard, D., Senon, J.-L., and Roblot, P. (1997) *Corticoïdes et corticothérapie*, Hermann.

66. Roblot, P., Richard, D., and Senon, J. (1997) *Corticoïdes et corticothérapie, les corticoïdes*
67. BRION, N., GUILLEVIN, L., and LE PARC, J.-M. (1998) *La corticothérapie en pratique*, LAVOISIER, Paris.
68. Karin, M., and Gallagher, E. (2005) From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance, *IUBMB Life* 57, 283-295.
69. Gonzalez, M. V., Jimenez, B., Berciano, M. T., Gonzalez-Sancho, J. M., Caelles, C., Lafarga, M., and Munoz, A. (2000) Glucocorticoids antagonize AP-1 by inhibiting the Activation/phosphorylation of JNK without affecting its subcellular distribution, *J Cell Biol* 150, 1199-1208.
70. Chen, W., Lee, J. Y., and Hsieh, W. C. (2002) Effects of dexamethasone and sex hormones on cytokine-induced cellular adhesion molecule expression in human endothelial cells, *Eur J Dermatol* 12, 445-448.
71. Boumpas, D. T., Chrousos, G. P., Wilder, R. L., Cupps, T. R., and Balow, J. E. (1993) Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates, *Ann Intern Med* 119, 1198-1208.
72. Oyanagui, Y., and Suzuki, S. (1986) Vasoregulin, a glucocorticoid-inducible vascular permeability inhibitory protein, *Agents Actions* 17, 270-277.
73. Di Rosa, M., Calignano, A., Carnuccio, R., Ialenti, A., and Sautebin, L. (1986) Multiple control of inflammation by glucocorticoids, *Agents Actions* 17, 284-289.
74. Bach, J. F. (1975) The mode of action of immunosuppressive agents, *Front Biol* 41, 1-374.
75. Schmidt, M., Pauels, H. G., Lugerling, N., Lugerling, A., Domschke, W., and Kucharzik, T. (1999) Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: potential role of IL-1 beta, *J Immunol* 163, 3484-3490.
76. Autio, P., Karjalainen, J., Risteli, L., Risteli, J., Kiistala, U., and Oikarinen, A. (1996) Effects of an inhaled steroid (budesonide) on skin collagen synthesis of asthma patients in vivo, *Am J Respir Crit Care Med* 153, 1172-1175.
77. Scheinman, R. I., Cogswell, P. C., Lofquist, A. K., and Baldwin, A. S., Jr. (1995) Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids, *Science* 270, 283-286.
78. Barnes, P. J. (2006) Corticosteroid effects on cell signalling, *Eur Respir J* 27, 413-426.
79. Jacqz-Aigrain, E., and Burtin, P. (1995) [Corticosteroids: pharmacology and indications of short courses in pediatrics], *Arch Pediatr* 2, 353-364.

80. Logie, J. J., Ali, S., Marshall, K. M., Heck, M. M., Walker, B. R., and Hadoke, P. W. (2010) Glucocorticoid-mediated inhibition of angiogenic changes in human endothelial cells is not caused by reductions in cell proliferation or migration, *PLoS One* 5, e14476.
81. Bikfalvi, A., Javerzat, S., Perollet, C., and Savona, C. (1997) [Angiogenesis and cancer], *Bull Cancer* 84, 885-890.
82. Shikatani, E. A., Trifonova, A., Mandel, E. R., Liu, S. T., Roudier, E., Krylova, A., Szigiato, A., Beaudry, J., Riddell, M. C., and Haas, T. L. (2012) Inhibition of proliferation, migration and proteolysis contribute to corticosterone-mediated inhibition of angiogenesis, *PLoS One* 7, e46625.
83. Henzen, C. (2003) Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires, *Forum Med Suisse* 442-446.
84. Benakis, C., Bonny, C., and Hirt, L. (2010) JNK inhibition and inflammation after cerebral ischemia, *Brain Behav Immun* 24, 800-811.
85. Reinecke, K., Eminel, S., Dierck, F., Roessner, W., Kersting, S., Chromik, A. M., Gavrilova, O., Laukeviciene, A., Leuschner, I., Waetzig, V., Rosenstiel, P., Herdegen, T., and Sina, C. (2012) The JNK inhibitor XG-102 protects against TNBS-induced colitis, *PLoS One* 7, e30985.
86. Han, Z., Boyle, D. L., Aupperle, K. R., Bennett, B., Manning, A. M., and Firestein, G. S. (1999) Jun N-terminal kinase in rheumatoid arthritis, *J Pharmacol Exp Ther* 291, 124-130.
87. Clancy, R., Rediske, J., Koehne, C., Stoyanovsky, D., Amin, A., Attur, M., Iyama, K., and Abramson, S. B. (2001) Activation of stress-activated protein kinase in osteoarthritic cartilage: evidence for nitric oxide dependence, *Osteoarthritis Cartilage* 9, 294-299.
88. Kersting, S., Behrendt, V., Kersting, J., Reinecke, K., Hilgert, C., Stricker, I., Herdegen, T., Janot, M. S., Uhl, W., and Chromik, A. M. (2013) The impact of JNK inhibitor D-JNKI-1 in a murine model of chronic colitis induced by dextran sulfate sodium, *J Inflamm Res* 6, 71-81.
89. Vaslin, A., Naegele-Tollardo, S., Puyal, J., and Clarke, P. G. (2011) Excitotoxicity-induced endocytosis mediates neuroprotection by TAT-peptide-linked JNK inhibitor, *J Neurochem* 119, 1243-1252.

90. Vives, E., Brodin, P., and Lebleu, B. (1997) A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus, *J Biol Chem* 272, 16010-16017.
91. Touchard, E., Omri, S., Naud, M. C., Berdugo, M., Deloche, C., Abadie, C., Jonet, L., Jeanny, J. C., Crisanti, P., de Kozak, Y., Combette, J. M., and Behar-Cohen, F. (2010) A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase for the treatment of endotoxin-induced uveitis, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 4683-4693.
92. Bonny, C., Oberson, A., Negri, S., Sauser, C., and Schorderet, D. F. (2001) Cell-permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death, *Diabetes* 50, 77-82.
93. Milano, G., Morel, S., Bonny, C., Samaja, M., von Segesser, L. K., Nicod, P., and Vassalli, G. (2007) A peptide inhibitor of c-Jun NH2-terminal kinase reduces myocardial ischemia-reperfusion injury and infarct size in vivo, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H1828-1835.
94. Sonsino, J., Gong, H., Wu, P., and Freddo, T. F. (2002) Co-localization of junction-associated proteins of the human blood--aqueous barrier: occludin, ZO-1 and F-actin, *Exp Eye Res* 74, 123-129.
95. Abellan, D. (2003) Cours d'anatomie oculaire. .
96. Behar-Cohen, F. (2009) Anatomie de la rétine, In *EMC Elsevier Masson*, Paris.
97. Cao, W., Wen, R., Li, F., Lavail, M. M., and Steinberg, R. H. (1997) Mechanical injury increases bFGF and CNTF mRNA expression in the mouse retina, *Exp Eye Res* 65, 241-248.
98. Dawson, D. W., Volpert, O. V., Gillis, P., Crawford, S. E., Xu, H., Benedict, W., and Bouck, N. P. (1999) Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis, *Science* 285, 245-248.
99. Khaliq, A., Patel, B., Jarvis-Evans, J., Moriarty, P., McLeod, D., and Boulton, M. (1995) Oxygen modulates production of bFGF and TGF-beta by retinal cells in vitro, *Exp Eye Res* 60, 415-423.
100. Strauss, O. (1995) The Retinal Pigment Epithelium.
101. Zmijewski, M. A., Sharma, R. K., and Slominski, A. T. (2007) Expression of molecular equivalent of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in adult retinal pigment epithelium, *J Endocrinol* 193, 157-169.

102. Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S. N., Osborne, N. N., and Reichenbach, A. (2006) Muller cells in the healthy and diseased retina, *Prog Retin Eye Res* 25, 397-424.
103. Kofuji, P., Ceelen, P., Zahs, K. R., Surbeck, L. W., Lester, H. A., and Newman, E. A. (2000) Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina, *J Neurosci* 20, 5733-5740.
104. Bringmann, A., Reichenbach, A., and Wiedemann, P. (2004) Pathomechanisms of cystoid macular edema, *Ophthalmic Res* 36, 241-249.
105. Regenfuss, B., Bock, F., Parthasarathy, A., and Cursiefen, C. (2008) Corneal (lymph)angiogenesis--from bedside to bench and back: a tribute to Judah Folkman, *Lymphat Res Biol* 6, 191-201.
106. Joussen, A., Gardner, T., Kirchhof, B., and Ryanpage, S. *Retinal Vascular Disease*
107. Cheung, C. Y., Ikram, M. K., Sabanayagam, C., and Wong, T. Y. (2012) Retinal microvasculature as a model to study the manifestations of hypertension, *Hypertension* 60, 1094-1103.
108. Harris, B., Klein, R., Jerosch-Herold, M., Hoffman, E. A., Ahmed, F. S., Jacobs, D. R., Jr., Klein, B. E., Wong, T. Y., Lima, J. A., Cotch, M. F., and Barr, R. G. (2012) The association of systemic microvascular changes with lung function and lung density: a cross-sectional study, *PLoS One* 7, e50224.
109. Flammer, J., and Mozaffarieh, M. (2008) Autoregulation, a balancing act between supply and demand, *Canadian Journal of Ophthalmology/Journal Canadien d'Ophtalmologie* 43, 317-321.
110. Guarneri, P., Guarneri, R., Cascio, C., Pavasant, P., Piccoli, F., and Papadopoulos, V. (1994) Neurosteroidogenesis in rat retinas, *J Neurochem* 63, 86-96.
111. Jobling, A. I., and Augusteyn, R. C. (2001) Is there a glucocorticoid receptor in the bovine lens?, *Exp Eye Res* 72, 687-694.
112. Mirshahi, M., Mirshahi, A., Sedighian, R., Hecquet, C., Faure, J. P., and Agarwal, M. K. (1997) Immunochemical demonstration of the mineralocorticoid receptor in ocular tissues, *Neuroendocrinology* 65, 70-78.
113. Young, S., Larkin, G., Branley, M., and Lightman, S. (2001) Safety and efficacy of intravitreal triamcinolone for cystoid macular oedema in uveitis, *Clin Experiment Ophthalmol* 29, 2-6.

114. Greenberg, P. B., Martidis, A., Rogers, A. H., Duker, J. S., and Reichel, E. (2002) Intravitreal triamcinolone acetonide for macular oedema due to central retinal vein occlusion, *Br J Ophthalmol* 86, 247-248.
115. Behar-Cohen, F. F., Gauthier, S., El Aouni, A., Chapon, P., Parel, J. M., Renard, G., and Chauvaud, D. (2001) Methylprednisolone concentrations in the vitreous and the serum after pulse therapy, *Retina* 21, 48-53.
116. Miyamoto, N., Iossifov, D., Metge, F., and Behar-Cohen, F. (2006) Early effects of intravitreal triamcinolone on macular edema: mechanistic implication, *Ophthalmology* 113, 2048-2053.
117. Narayanan, R., Mungcal, J. K., Kenney, M. C., Seigel, G. M., and Kuppermann, B. D. (2006) Toxicity of triamcinolone acetonide on retinal neurosensory and pigment epithelial cells, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 722-728.
118. Coscas, G. (2011) *OEdèmes maculaires: aspects cliniques et thérapeutiques*, Springer-Verlag, Paris.
119. de Smet, M. D., Taylor, S. R., Bodaghi, B., Miserocchi, E., Murray, P. I., Pleyer, U., Zierhut, M., Barisani-Asenbauer, T., LeHoang, P., and Lightman, S. (2011) Understanding uveitis: the impact of research on visual outcomes, *Prog Retin Eye Res* 30, 452-470.
120. Torriglia, A., Valamanesh, F., and Behar-Cohen, F. (2010) On the retinal toxicity of intraocular glucocorticoids, *Biochem Pharmacol* 80, 1878-1886.
121. Valamanesh, F., Berdugo, M., Sennlaub, F., Savoldelli, M., Goumeaux, C., Houssier, M., Jeanny, J. C., Torriglia, A., and Behar-Cohen, F. (2009) Effects of triamcinolone acetonide on vessels of the posterior segment of the eye, *Mol Vis* 15, 2634-2648.
122. Wang, Y. S., Friedrichs, U., Eichler, W., Hoffmann, S., and Wiedemann, P. (2002) Inhibitory effects of triamcinolone acetonide on bFGF-induced migration and tube formation in choroidal microvascular endothelial cells, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 240, 42-48.
123. Blecharz, K. G., Haghikia, A., Stasiolek, M., Kruse, N., Drenckhahn, D., Gold, R., Roewer, N., Chan, A., and Forster, C. Y. (2010) Glucocorticoid effects on endothelial barrier function in the murine brain endothelial cell line cEND incubated with sera from patients with multiple sclerosis, *Mult Scler* 16, 293-302.
124. Hartnett, M. E., Martiniuk, D. J., Saito, Y., Geisen, P., Peterson, L. J., and McColm, J. R. (2006) Triamcinolone reduces neovascularization, capillary density and IGF-1

- receptor phosphorylation in a model of oxygen-induced retinopathy, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 4975-4982.
125. Dot, C., Parier, V., Behar-Cohen, F., Benezra, D., Jonet, L., Goldenberg, B., Picard, E., Camelo, S., de Kozak, Y., May, F., Soubrane, G., and Jeanny, J. C. (2009) Influence of age on retinochoroidal healing processes after argon photocoagulation in C57bl/6j mice, *Mol Vis* 15, 670-684.
 126. Szurman, P., Sierra, A., Kaczmarek, R., Jaissle, G. B., Wallenfels-Thilo, B., Grisanti, S., Luke, M., Bartz-Schmidt, K. U., and Spitzer, M. S. (2007) Different biocompatibility of crystalline triamcinolone deposits on retinal cells in vitro and in vivo, *Exp Eye Res* 85, 44-53.
 127. Folkman, J., and Ingber, D. E. (1987) Angiostatic steroids. Method of discovery and mechanism of action, *Ann Surg* 206, 374-383.
 128. Katychev, A., Wang, X., Duffy, A., and Dore-Duffy, P. (2003) Glucocorticoid-induced apoptosis in CNS microvascular pericytes, *Dev Neurosci* 25, 436-446.
 129. Hu, Z. M., Wang, H. B., Zhou, M. Q., Yao, X. S., Ma, L., and Wang, X. N. (2006) [Pathological changes of the blood vessels in rabbit femoral head with glucocorticoid-induced necrosis], *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 26, 785-787.
 130. Lockshin, R. A., and Williams, C. M. (1965) Programmed cell death. V. Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms, *J Insect Physiol* 11, 831-844.
 131. Stevens, J. B., Abdallah, B. Y., Liu, G., Horne, S. D., Bremer, S. W., Ye, K. J., Huang, J. Y., Kurkinen, M., Ye, C. J., and Heng, H. H. (2013) Heterogeneity of cell death, *Cytogenet Genome Res* 139, 164-173.
 132. Kroemer, G., and Martin, S. J. (2005) Caspase-independent cell death, *Nat Med* 11, 725-730.
 133. Jaattela, M., and Tschopp, J. (2003) Caspase-independent cell death in T lymphocytes, *Nat Immunol* 4, 416-423.
 134. Cherlonneix, L. (2007) Recherches sur l'auto-initiation de la Mort cellulaire à la fin du XIXe siècle, In *Gesnerus* 64 pp 193-218, Prague.
 135. W, F. (1885) Über die Bildung von Richtungsfiguren in Säugethiereiern beim Untergang Graafscher Follikel., *Arch. Anat. EntwGesch.*, 221-244. .
 136. Glucksmann, A. (1965) Cell death in normal development., *Archives de Biologie* 76, 419-437.

137. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer* 26, 239-257.
138. Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D. R., Hengartner, M. O., Kepp, O., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nunez, G., Peter, M. E., Piacentini, M., Rubinsztein, D. C., Shi, Y., Simon, H. U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G., and Kroemer, G. (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012, *Cell Death Differ* 19, 107-120.
139. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., and Melino, G. (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009, *Cell Death Differ* 16, 3-11.
140. Giansanti, V., Torriglia, A., and Scovassi, A. I. (2011) Conversation between apoptosis and autophagy: "Is it your turn or mine?", *Apoptosis* 16, 321-333.
141. Yuan, J., Lipinski, M., and Degtarev, A. (2003) Diversity in the Mechanisms of Neuronal Cell Death, *Neuron* 40, 401-413.
142. Nishino, I. (2003) Autophagic vacuolar myopathies, *Curr Neurol Neurosci Rep* 3, 64-69.
143. Fulda, S. (2012) Autophagy and cell death, *Autophagy* 8, 1250-1251.
144. Boya, P., Gonzalez-Polo, R. A., Casares, N., Perfettini, J. L., Dessen, P., Larochette, N., Metivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., Pierron, G., Codogno, P., and Kroemer, G. (2005) Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis, *Mol Cell Biol* 25, 1025-1040.
145. Abedin, M. J., Wang, D., McDonnell, M. A., Lehmann, U., and Kelekar, A. (2007) Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage, *Cell Death Differ* 14, 500-510.
146. Giansanti, V., Rodriguez, G. E., Savoldelli, M., Gioia, R., Forlino, A., Mazzini, G., Pennati, M., Zaffaroni, N., Scovassi, A. I., and Torriglia, A. (2013) Characterization of stress response in human retinal epithelial cells, *J Cell Mol Med* 17, 103-115.

147. Yang, Z., and Klionsky, D. J. (2010) Eaten alive: a history of macroautophagy, *Nat Cell Biol* 12, 814-822.
148. Till, A., Lakhani, R., Burnett, S. F., and Subramani, S. (2012) Pexophagy: the selective degradation of peroxisomes, *Int J Cell Biol* 2012, 512721.
149. Singh, R., and Cuervo, A. M. (2011) Autophagy in the cellular energetic balance, *Cell Metab* 13, 495-504.
150. Sridhar, S., Botbol, Y., Macian, F., and Cuervo, A. M. (2012) Autophagy and disease: always two sides to a problem, *J Pathol* 226, 255-273.
151. Yorimitsu, T., and Klionsky, D. J. (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating, *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1542-1552.
152. Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., Vanlangenakker, N., Buettner, S., Eisenberg, T., Vandenabeele, P., Madeo, F., and Kroemer, G. (2011) Programmed necrosis from molecules to health and disease, *Int Rev Cell Mol Biol* 289, 1-35.
153. Kaiser, W. J., Upton, J. W., Long, A. B., Livingston-Rosanoff, D., Daley-Bauer, L. P., Hakem, R., Caspary, T., and Mocarski, E. S. (2011) RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice, *Nature* 471, 368-372.
154. Ricci, J. E., Gottlieb, R. A., and Green, D. R. (2003) Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis, *J Cell Biol* 160, 65-75.
155. Kumar, S. (2007) Caspase function in programmed cell death, *Cell Death Differ* 14, 32-43.
156. Shi, Y. (2004) Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view, *Protein Sci* 13, 1979-1987.
157. Salvesen, G. S., and Abrams, J. M. (2004) Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies, *Oncogene* 23, 2774-2784.
158. MacKenzie, S. H., and Clark, A. C. (2008) Targeting cell death in tumors by activating caspases, *Curr Cancer Drug Targets* 8, 98-109.
159. Fuentes-Prior, P., and Salvesen, G. S. (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition, *Biochem J* 384, 201-232.
160. Mukae, N., Enari, M., Sakahira, H., Fukuda, Y., Inazawa, J., Toh, H., and Nagata, S. (1998) Molecular cloning and characterization of human caspase-activated DNase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9123-9128.

161. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature* 391, 43-50.
162. Yoshida, A., Pommier, Y., and Ueda, T. (2006) Endonuclease activation and chromosomal DNA fragmentation during apoptosis in leukemia cells, *Int J Hematol* 84, 31-37.
163. Samejima, K., and Earnshaw, W. C. (2005) Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis, *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 677-688.
164. Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, *Cell* 94, 491-501.
165. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors, *Cell* 94, 481-490.
166. Virag, L., Robaszekiewicz, A., Vargas, J. M., and Javier Oliver, F. (2013) Poly(ADP-ribose) signaling in cell death, *Mol Aspects Med*.
167. D'Amours, D., Sallmann, F. R., Dixit, V. M., and Poirier, G. G. (2001) Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis, *J Cell Sci* 114, 3771-3778.
168. Germain, M., Affar, E. B., D'Amours, D., Dixit, V. M., Salvesen, G. S., and Poirier, G. G. (1999) Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7, *J Biol Chem* 274, 28379-28384.
169. D'Amours, D., Germain, M., Orth, K., Dixit, V. M., and Poirier, G. G. (1998) Proteolysis of poly(ADP-ribose) polymerase by caspase 3: kinetics of cleavage of mono(ADP-ribosyl)ated and DNA-bound substrates, *Radiat Res* 150, 3-10.
170. Simbulan-Rosenthal, C. M., Rosenthal, D. S., Iyer, S., Boulares, H., and Smulson, M. E. (1999) Involvement of PARP and poly(ADP-ribosylation) in the early stages of apoptosis and DNA replication, *Mol Cell Biochem* 193, 137-148.
171. Krishnakumar, R., and Kraus, W. L. (2010) The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets, *Mol Cell* 39, 8-24.
172. Youle, R. J., and Strasser, A. (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death, *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.
173. Giam, M., Huang, D. C., and Bouillet, P. (2008) BH3-only proteins and their roles in programmed cell death, *Oncogene* 27 Suppl 1, S128-136.

174. Rautureau, G. J., Day, C. L., and Hinds, M. G. (2010) Intrinsically disordered proteins in bcl-2 regulated apoptosis, *Int J Mol Sci* 11, 1808-1824.
175. Mignotte, B., and Vayssiere, J. L. (1998) Mitochondria and apoptosis, *Eur J Biochem* 252, 1-15.
176. Petit, P. X., Zamzami, N., Vayssiere, J. L., Mignotte, B., Kroemer, G., and Castedo, M. (1997) Implication of mitochondria in apoptosis, *Mol Cell Biochem* 174, 185-188.
177. Estaquier, J., Vallette, F., Vayssiere, J. L., and Mignotte, B. (2012) The mitochondrial pathways of apoptosis, *Adv Exp Med Biol* 942, 157-183.
178. Green, D. R., and Kroemer, G. (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death, *Science* 305, 626-629.
179. Vieira, H. L., and Kroemer, G. (1999) Pathophysiology of mitochondrial cell death control, *Cell Mol Life Sci* 56, 971-976.
180. Monteiro, J. P., Oliveira, P. J., and Jurado, A. S. (2013) Mitochondrial membrane lipid remodeling in pathophysiology: A new target for diet and therapeutic interventions, *Prog Lipid Res* 52, 513-528.
181. Reubold, T. F., and Eschenburg, S. (2012) A molecular view on signal transduction by the apoptosome, *Cell Signal* 24, 1420-1425.
182. Jourdain, A., and Martinou, J. C. (2009) Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis, *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1884-1889.
183. Hansen, T. M., Smith, D. J., and Nagley, P. (2006) Smac/DIABLO is not released from mitochondria during apoptotic signalling in cells deficient in cytochrome c, *Cell Death Differ* 13, 1181-1190.
184. Martinez-Ruiz, G., Maldonado, V., Ceballos-Cancino, G., Grajeda, J. P., and Melendez-Zajgla, J. (2008) Role of Smac/DIABLO in cancer progression, *J Exp Clin Cancer Res* 27, 48.
185. van Gurp, M., Festjens, N., van Loo, G., Saelens, X., and Vandenabeele, P. (2003) Mitochondrial intermembrane proteins in cell death, *Biochem Biophys Res Commun* 304, 487-497.
186. Li, L. Y., Luo, X., and Wang, X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria, *Nature* 412, 95-99.
187. Parrish, J., Li, L., Klotz, K., Ledwich, D., Wang, X., and Xue, D. (2001) Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*, *Nature* 412, 90-94.

188. Mate, M. J., Ortiz-Lombardia, M., Boitel, B., Haouz, A., Tello, D., Susin, S. A., Penninger, J., Kroemer, G., and Alzari, P. M. (2002) The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF, *Nat Struct Biol* 9, 442-446.
189. Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S. A., Zamzami, N., and Kroemer, G. (2000) Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis, *FEBS Lett* 476, 118-123.
190. Joza, N., Pospisilik, J. A., Hangen, E., Hanada, T., Modjtahedi, N., Penninger, J. M., and Kroemer, G. (2009) AIF: not just an apoptosis-inducing factor, *Ann N Y Acad Sci* 1171, 2-11.
191. Norberg, E., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2010) Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF), *Biochem Biophys Res Commun* 396, 95-100.
192. Artus, C., Boujrad, H., Bouharrou, A., Brunelle, M. N., Hoos, S., Yuste, V. J., Lenormand, P., Rousselle, J. C., Namane, A., England, P., Lorenzo, H. K., and Susin, S. A. (2010) AIF promotes chromatinolysis and caspase-independent programmed necrosis by interacting with histone H2AX, *EMBO J* 29, 1585-1599.
193. Lorenzo, H. K., Susin, S. A., Penninger, J., and Kroemer, G. (1999) Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death, *Cell Death Differ* 6, 516-524.
194. Hangen, E., Blomgren, K., Benit, P., Kroemer, G., and Modjtahedi, N. (2010) Life with or without AIF, *Trends Biochem Sci* 35, 278-287.
195. Yu, S. W., Wang, Y., Frydenlund, D. S., Ottersen, O. P., Dawson, V. L., and Dawson, T. M. (2009) Outer mitochondrial membrane localization of apoptosis-inducing factor: mechanistic implications for release, *ASN Neuro* 1.
196. Yang, X., Wang, J., Zhou, Y., Wang, Y., Wang, S., and Zhang, W. (2012) Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells, *Cancer Lett* 321, 137-143.
197. Choudhury, S., Bae, S., Ke, Q., Lee, J. Y., Kim, J., and Kang, P. M. (2011) Mitochondria to nucleus translocation of AIF in mice lacking Hsp70 during ischemia/reperfusion, *Basic Res Cardiol* 106, 397-407.
198. Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebbersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., and Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature* 397, 441-446.

199. Cande, C., Vahsen, N., Kouranti, I., Schmitt, E., Daugas, E., Spahr, C., Luban, J., Kroemer, R. T., Giordanetto, F., Garrido, C., Penninger, J. M., and Kroemer, G. (2004) AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis, *Oncogene* 23, 1514-1521.
200. Wang, X., Yang, C., Chai, J., Shi, Y., and Xue, D. (2002) Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*, *Science* 298, 1587-1592.
201. Lepretre, C., Tchakarska, G., Blibech, H., Lebon, C., and Torriglia, A. (2013) Apoptosis-inducing factor (AIF) and leukocyte elastase inhibitor/L-DNase II (LEI/LDNaseII), can interact to conduct caspase-independent cell death, *Apoptosis* 18, 1048-1059.
202. Tan, Y., Wu, C., De Veyra, T., and Greer, P. A. (2006) Ubiquitous calpains promote both apoptosis and survival signals in response to different cell death stimuli, *J Biol Chem* 281, 17689-17698.
203. Croall, D. E., and Ersfeld, K. (2007) The calpains: modular designs and functional diversity, *Genome Biol* 8, 218.
204. Tardy, C., Codogno, P., Autefage, H., Levade, T., and Andrieu-Abadie, N. (2006) Lysosomes and lysosomal proteins in cancer cell death (new players of an old struggle), *Biochim Biophys Acta* 1765, 101-125.
205. Kroemer, G., and Jaattela, M. (2005) Lysosomes and autophagy in cell death control, *Nat Rev Cancer* 5, 886-897.
206. Villalpando Rodriguez, G. E., and Torriglia, A. (2013) Calpain 1 induce lysosomal permeabilization by cleavage of lysosomal associated membrane protein 2, *Biochim Biophys Acta* 1833, 2244-2253.
207. Chahory, S., Keller, N., Martin, E., Omri, B., Crisanti, P., and Torriglia, A. (2010) Light induced retinal degeneration activates a caspase-independent pathway involving cathepsin D, *Neurochem Int* 57, 278-287.
208. Chahory, S., Padron, L., Courtois, Y., and Torriglia, A. (2004) The LEI/L-DNase II pathway is activated in light-induced retinal degeneration in rats, *Neurosci Lett* 367, 205-209.
209. Trapani, J. A. (2001) Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases, *Genome Biol* 2, REVIEWS3014.

210. Cao, X., Cai, S. F., Fehniger, T. A., Song, J., Collins, L. I., Piwnica-Worms, D. R., and Ley, T. J. (2007) Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance, *Immunity* 27, 635-646.
211. Lieberman, J. (2010) Granzyme A activates another way to die, *Immunol Rev* 235, 93-104.
212. Martinvalet, D., Dykxhoorn, D. M., Ferrini, R., and Lieberman, J. (2008) Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death, *Cell* 133, 681-692.
213. Nagata, S., and Kawane, K. (2011) Autoinflammation by endogenous DNA, *Adv Immunol* 110, 139-161.
214. Nagata, S. (2007) Autoimmune diseases caused by defects in clearing dead cells and nuclei expelled from erythroid precursors, *Immunol Rev* 220, 237-250.
215. Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N., and Fukuyama, H. (2003) Degradation of chromosomal DNA during apoptosis, *Cell Death Differ* 10, 108-116.
216. Mukae, N., Yokoyama, H., Yokokura, T., Sakoyama, Y., and Nagata, S. (2002) Activation of the innate immunity in *Drosophila* by endogenous chromosomal DNA that escaped apoptotic degradation, *Genes Dev* 16, 2662-2671.
217. Herschleb, J., Ananiev, G., and Schwartz, D. C. (2007) Pulsed-field gel electrophoresis, *Nat Protoc* 2, 677-684.
218. Di Filippo, M., and Bernardi, G. (2009) The early apoptotic DNA fragmentation targets a small number of specific open chromatin regions, *PLoS One* 4, e5010.
219. Counis, M. F., and Torriglia, A. (2006) Acid DNases and their interest among apoptotic endonucleases, *Biochimie* 88, 1851-1858.
220. Oliveri, M., Daga, A., Cantoni, C., Lunardi, C., Millo, R., and Puccetti, A. (2001) DNase I mediates internucleosomal DNA degradation in human cells undergoing drug-induced apoptosis, *Eur J Immunol* 31, 743-751.
221. Aleksandrushkina, N. I., and Vanyushin, B. F. (2012) Endonucleases and apoptosis in animals, *Biochemistry (Mosc)* 77, 1436-1451.
222. Liu, X., Zou, H., Widlak, P., Garrard, W., and Wang, X. (1999) Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1, *J Biol Chem* 274, 13836-13840.
223. Scovassi, A. I., and Torriglia, A. (2003) Activation of DNA-degrading enzymes during apoptosis, *Eur J Histochem* 47, 185-194.

224. Counis, M. F., and Torriglia, A. (2000) DNases and apoptosis, *Biochem Cell Biol* 78, 405-414.
225. Torriglia, A., Perani, P., Brossas, J. Y., Chaudun, E., Treton, J., Courtois, Y., and Counis, M. F. (1998) L-DNase II, a molecule that links proteases and endonucleases in apoptosis, derives from the ubiquitous serpin leukocyte elastase inhibitor, *Mol Cell Biol* 18, 3612-3619.
226. Dubin, A., Travis, J., Enghild, J. J., and Potempa, J. (1992) Equine leukocyte elastase inhibitor. Primary structure and identification as a thymosin-binding protein, *J Biol Chem* 267, 6576-6583.
227. Izuhara, K., Ohta, S., Kanaji, S., Shiraishi, H., and Arima, K. (2008) Recent progress in understanding the diversity of the human ov-serpin/clade B serpin family, *Cell Mol Life Sci* 65, 2541-2553.
228. Silverman, G. A., Whisstock, J. C., Askew, D. J., Pak, S. C., Luke, C. J., Cataltepe, S., Irving, J. A., and Bird, P. I. (2004) Human clade B serpins (ov-serpins) belong to a cohort of evolutionarily dispersed intracellular proteinase inhibitor clades that protect cells from promiscuous proteolysis, *Cell Mol Life Sci* 61, 301-325.
229. Padron-Barthe, L., Lepretre, C., Martin, E., Counis, M. F., and Torriglia, A. (2007) Conformational modification of serpins transforms leukocyte elastase inhibitor into an endonuclease involved in apoptosis, *Mol Cell Biol* 27, 4028-4036.
230. Padron-Barthe, L., Courta, J., Lepretre, C., Nagbou, A., and Torriglia, A. (2008) Leukocyte Elastase Inhibitor, the precursor of L-DNase II, inhibits apoptosis by interfering with caspase-8 activation, *Biochim Biophys Acta* 1783, 1755-1766.
231. Martin, E., Counis, M.-F., Perani, P., Courtois, Y., and Torriglia, A. (2002) LEI/L-DNase II: les implications structurales d'un détournement de fonction, *médecine/sciences* 18, 111-120.
232. Grutter, M. G. (1994) Proteinase inhibitors: another new fold, *Structure* 2, 575-576.
233. Potempa, J., Korzus, E., and Travis, J. (1994) The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation, *J Biol Chem* 269, 15957-15960.
234. Springhetti, E. M., Istomina, N. E., Whisstock, J. C., Nikitina, T., Woodcock, C. L., and Grigoryev, S. A. (2003) Role of the M-loop and reactive center loop domains in the folding and bridging of nucleosome arrays by MENT, *J Biol Chem* 278, 43384-43393.

235. Latha, K., Zhang, W., Cella, N., Shi, H. Y., and Zhang, M. (2005) Maspin mediates increased tumor cell apoptosis upon induction of the mitochondrial permeability transition, *Mol Cell Biol* 25, 1737-1748.
236. Gooptu, B., and Lomas, D. A. (2009) Conformational pathology of the serpins: themes, variations, and therapeutic strategies, *Annu Rev Biochem* 78, 147-176.
237. Torriglia, A., Perani, P., Brossas, J. Y., Altairac, S., Zeggai, S., Martin, E., Treton, J., Courtois, Y., and Counis, M. F. (2000) A caspase-independent cell clearance program. The LEI/L-DNase II pathway, *Ann N Y Acad Sci* 926, 192-203.
238. Torriglia, A., Chaudun, E., Courtois, Y., and Counis, M. F. (1997) On the use of Zn²⁺ to discriminate endonucleases activated during apoptosis, *Biochimie* 79, 435-438.
239. Lepretre, C., Fleurier, Y., Martin, E., and Torriglia, A. (2008) Nuclear export of LEI/L-DNase II by Crm1 is essential for cell survival, *Biochim Biophys Acta* 1783, 1068-1075.
240. Torriglia, A., Chaudun, E., Chany-Fournier, F., Jeanny, J. C., Courtois, Y., and Counis, M. F. (1995) Involvement of DNase II in nuclear degeneration during lens cell differentiation, *J Biol Chem* 270, 28579-28585.
241. Torriglia, A., Chaudun, E., Chany-Fournier, F., Courtois, Y., and Counis, M. F. (2001) Involvement of L-DNase II in nuclear degeneration during chick retina development, *Exp Eye Res* 72, 443-453.
242. Torriglia, A., Negri, C., Chaudun, E., Prospero, E., Courtois, Y., Counis, M. F., and Scovassi, A. I. (1999) Differential involvement of DNases in HeLa cell apoptosis induced by etoposide and long term-culture, *Cell Death Differ* 6, 234-244.
243. Gorrini, C., Donzelli, M., Torriglia, A., Supino, R., Brison, O., Bernardi, R., Negri, C., Denegri, M., Counis, M. F., Ranzani, G. N., and Scovassi, A. I. (2003) Effect of apoptogenic stimuli on colon carcinoma cell lines with a different c-myc expression level, *Int J Mol Med* 11, 737-742.
244. Altairac, S., Zeggai, S., Perani, P., Courtois, Y., and Torriglia, A. (2003) Apoptosis induced by Na⁺/H⁺ antiport inhibition activates the LEI/L-DNase II pathway, *Cell Death Differ* 10, 548-557.
245. Belmokhtar, C. A., Torriglia, A., Counis, M. F., Courtois, Y., Jacquemin-Sablon, A., and Segal-Bendirdjian, E. (2000) Nuclear translocation of a leukocyte elastase Inhibitor/Elastase complex during staurosporine-induced apoptosis: role in the generation of nuclear L-DNase II activity, *Exp Cell Res* 254, 99-109.

246. Brossas, J. Y., Tanguy, R., Brignole-Baudouin, F., Courtois, Y., Torriglia, A., and Treton, J. (2004) L-DNase II associated with active process during ethanol induced cell death in ARPE-19, *Mol Vis* 10, 65-73.
247. Galluzzi, L., Kepp, O., and Kroemer, G. (2010) TP53 and MTOR crosstalk to regulate cellular senescence, *Aging (Albany NY)* 2, 535-537.
248. Hausmann, M., Leucht, K., Ploner, C., Kiessling, S., Villunger, A., Becker, H., Hofmann, C., Falk, W., Krebs, M., Kellermeier, S., Fried, M., Scholmerich, J., Obermeier, F., and Rogler, G. (2011) BCL-2 modifying factor (BMF) is a central regulator of anoikis in human intestinal epithelial cells, *J Biol Chem* 286, 26533-26540.
249. Krajcovic, M., and Overholtzer, M. (2012) Mechanisms of ploidy increase in human cancers: a new role for cell cannibalism, *Cancer research* 72, 1596-1601.
250. Wang, Y., Dawson, V. L., and Dawson, T. M. (2009) Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos, *Exp Neurol* 218, 193-202.
251. David, K. K., Andrabi, S. A., Dawson, T. M., and Dawson, V. L. (2009) Parthanatos, a messenger of death, *Front Biosci (Landmark Ed)* 14, 1116-1128.
252. Remijsen, Q., Kuijpers, T., Wirawan, E., Lippens, S., Vandenabeele, P., and Berghe, T. V. (2011) Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality, *Cell Death & Differentiation* 18, 581-588.
253. Candi, E., Schmidt, R., and Melino, G. (2005) The cornified envelope: a model of cell death in the skin, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 328-340.
254. Cunningham, M. A., Edelman, J. L., and Kaushal, S. (2008) Intravitreal steroids for macular edema: the past, the present, and the future, *Surv Ophthalmol* 53, 139-149.
255. Valamanesh, F., Torriglia, A., Savoldelli, M., Gandolphe, C., Jeanny, J. C., BenEzra, D., and Behar-Cohen, F. (2007) Glucocorticoids induce retinal toxicity through mechanisms mainly associated with paraptosis, *Mol Vis* 13, 1746-1757.
256. Samarasinghe, R. A., Witchell, S. F., and DeFranco, D. B. (2012) Cooperativity and complementarity: synergies in non-classical and classical glucocorticoid signaling, *Cell Cycle* 11, 2819-2827.
257. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods* 65, 55-63.
258. Spandau, U. H., Sauder, G., Schubert, U., Hammes, H. P., and Jonas, J. B. (2005) Effect of triamcinolone acetonide on proliferation of retinal endothelial cells in vitro and in vivo, *Br J Ophthalmol* 89, 745-747.

259. Spandau, U. H., Derse, M., Schmitz-Valckenberg, P., Papoulis, C., Sagstetter, B. U., Stiefvater, K., and Jonas, J. B. (2005) Triamcinolone acetonide concentration after filtration of the solvent agent, *Am J Ophthalmol* 139, 712-713.
260. Ashish, J., Muralidhar, R., Vijayalakshmi, P., and Meenakshi, S. (2011) Freeman-Sheldon syndrome: case report and review of the literature, *Int Ophthalmol* 31, 405-407.
261. Chang, Y. S., Lin, C. F., Wu, C. L., Kuo, P. Y., Wu, F. S., Shieh, C. C., Gean, P. W., Chen, S. T., Chen, M. S., Wu, W. C., Tai, M. H., and Tseng, S. H. (2011) Mechanisms underlying benzyl alcohol cytotoxicity (triamcinolone acetonide preservative) in human retinal pigment epithelial cells, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 4214-4222.
262. Kai, W., Yanrong, J., and Xiaoxin, L. (2006) Vehicle of triamcinolone acetonide is associated with retinal toxicity and transient increase of lens density, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 244, 1152-1159.
263. GUERRESCHI, E., HAUSSY, B., COLLETTE, M., BRICQ, S., CHAUVET, P., L'HUILLIER, J., and LEFTHERIOTIS, G. (2011) Mesures et analyses biomécaniques des interactions macrocirculation/microcirculation sanguines, *20ème Congrès Français de Mécanique, 28 août/2 sept. 2011-25044 Besançon, France (FR)*.
264. Stewart, P., and Tuor, U. (1994) Blood-eye barriers in the rat: Correlation of ultrastructure with function, *Journal of Comparative Neurology* 340, 566-576.
265. de Backer, D. (2013) Interactions macro-et microcirculatoires dans le choc, *Réanimation* 22, 191-195.
266. Askari, A. D., Feihl, F., and Waeber, B. (2009) Hypertension artérielle, *Rev Med Suisse* 5, 1778-1782.
267. LaVail, M. M., Unoki, K., Yasumura, D., Matthes, M. T., Yancopoulos, G. D., and Steinberg, R. H. (1992) Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 11249-11253.
268. Denniston, A. K., Kottoor, S. H., Khan, I., Oswal, K., Williams, G. P., Abbott, J., Wallace, G. R., Salmon, M., Rauz, S., Murray, P. I., and Curnow, S. J. (2011) Endogenous cortisol and TGF-beta in human aqueous humor contribute to ocular immune privilege by regulating dendritic cell function, *J Immunol* 186, 305-311.
269. Knisely, T. L., Hosoi, J., Nazareno, R., and Granstein, R. D. (1994) The presence of biologically significant concentrations of glucocorticoids but little or no cortisol

- binding globulin within aqueous humor: relevance to immune privilege in the anterior chamber of the eye, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 3711-3723.
270. Spitzer, M. S., Mlynczak, T., Schultheiss, M., Rinker, K., Yoeruek, E., Petermeier, K., Januschowski, K., and Szurman, P. (2011) Preservative-free triamcinolone acetonide injectable suspension versus “traditional” triamcinolone preparations: impact of aggregate size on retinal biocompatibility, *Retina* 31, 2050-2057.
271. Luke, M., Januschowski, K., Beutel, J., Warga, M., Grisanti, S., Peters, S., Schneider, T., Luke, C., Bartz-Schmidt, K. U., and Szurman, P. (2008) The effects of triamcinolone crystals on retinal function in a model of isolated perfused vertebrate retina, *Exp Eye Res* 87, 22-29.
272. Bourges, J. L., Valamanesh, F., Torriglia, A., Jeanny, J. C., Savoldelli, M., Renard, G., BenEzra, D., de Kozak, Y., and Behar-Cohen, F. (2004) Cornea graft endothelial cells undergo apoptosis by way of an alternate (caspase-independent) pathway, *Transplantation* 78, 316-323.
273. Yang, Y., Lou, J., Li, Z., Sun, W., Wang, B., and Jia, Y. (2011) [Effect of glucocorticoid on production of reactive oxygen species in bone microvascular endothelial cells], *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 25, 533-537.
274. Chen, W.-L., Lin, C.-T., Yao, C.-C., Huang, Y.-H., Chou, Y.-B., Yin, H.-S., and Hu, F.-R. (2006) In-vitro effects of dexamethasone on cellular proliferation, apoptosis, and Na⁺-K⁺-ATPase activity of bovine corneal endothelial cells, *Ocular Immunology and Inflammation* 14, 215-223.
275. Yeung, C. K., Chan, K. P., Chan, C. K., Pang, C. P., and Lam, D. S. (2004) Cytotoxicity of triamcinolone on cultured human retinal pigment epithelial cells: comparison with dexamethasone and hydrocortisone, *Japanese journal of ophthalmology* 48, 236-242.
276. Montecucco, A., and Biamonti, G. (2007) Cellular response to etoposide treatment, *Cancer Lett* 252, 9-18.
277. Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G., and Earnshaw, W. C. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE, *Nature* 371, 346-347.
278. Fischer, U., Janicke, R. U., and Schulze-Osthoff, K. (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates, *Cell Death Differ* 10, 76-100.
279. Sharma, A., Pirouzmanesh, A., Patil, J., Estrago-Franco, M. F., Zacharias, L. C., Andley, U. P., Kenney, M. C., and Kuppermann, B. D. (2011) Evaluation of the

- toxicity of triamcinolone acetonide and dexamethasone sodium phosphate on human lens epithelial cells (HLE B-3), *J Ocul Pharmacol Ther* 27, 265-271.
280. Chung, H., Hwang, J. J., Koh, J. Y., Kim, J. G., and Yoon, Y. H. (2007) Triamcinolone acetonide-mediated oxidative injury in retinal cell culture: comparison with dexamethasone, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 5742-5749.
281. Yeung, C. K., Chan, K. P., Chiang, S. W., Pang, C. P., and Lam, D. S. (2003) The toxic and stress responses of cultured human retinal pigment epithelium (ARPE19) and human glial cells (SVG) in the presence of triamcinolone, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 5293-5300.
282. Distelhorst, C. (2002) Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis, *Cell death and differentiation* 9, 6-19.
283. Huc, L., Rissel, M., Solhaug, A., Tekpli, X., Gorria, M., Torriglia, A., Holme, J. A., Dimanche-Boitrel, M. T., and Lagadic-Gossmann, D. (2006) Multiple apoptotic pathways induced by p53-dependent acidification in benzo[a]pyrene-exposed hepatic F258 cells, *J Cell Physiol* 208, 527-537.
284. Kirton, J. P., Wilkinson, F. L., Canfield, A. E., and Alexander, M. Y. (2006) Dexamethasone downregulates calcification-inhibitor molecules and accelerates osteogenic differentiation of vascular pericytes: implications for vascular calcification, *Circ Res* 98, 1264-1272.
285. Hattori, T., Murase, T., Iwase, E., Takahashi, K., Ohtake, M., Tsuboi, K., Miyachi, M., Murohara, T., and Nagata, K. (2013) Glucocorticoid-induced hypertension and cardiac injury: effects of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor antagonism, *Nagoya J Med Sci* 75, 81-92.
286. Ahnstrom, G. (1988) Techniques to measure DNA single-strand breaks in cells: a review, *Int J Radiat Biol* 54, 695-707.
287. McKenzie, A., and Stoughton, R. (1962) Method for comparing percutaneous absorption of steroids, *Archives of Dermatology* 86, 608.
288. Folkman, J., Langer, R., Linhardt, R. J., Haudenschild, C., and Taylor, S. (1983) Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone, *Science* 221, 719-725.
289. Tatar, O., Adam, A., Shinoda, K., Kaiserling, E., Boeyden, V., Claes, C., Eckardt, C., Eckert, T., Pertile, G., Scharioth, G. B., Yoeruek, E., Szurman, P., Bartz-Schmidt, K. U., and Grisanti, S. (2009) Early effects of intravitreal triamcinolone acetonide on

- inflammation and proliferation in human choroidal neovascularization, *Arch Ophthalmol* 127, 275-281.
290. Lemaire, L. C., de Kruif, M. D., Giebelen, I. A., van Zoelen, M. A., van't Veer, C., and van der Poll, T. (2008) Differential dose-dependent effects of prednisolone on shedding of endothelial adhesion molecules during human endotoxemia, *Immunol Lett* 121, 93-96.
291. Sears, J. E., and Hoppe, G. (2005) Triamcinolone acetonide destabilizes VEGF mRNA in Muller cells under continuous cobalt stimulation, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 4336-4341.
292. Antonetti, D. A., Lieth, E., Barber, A. J., and Gardner, T. W. (1999) Molecular mechanisms of vascular permeability in diabetic retinopathy, *Semin Ophthalmol* 14, 240-248.
293. Aiello, L. P. (1997) Vascular endothelial growth factor and the eye: biochemical mechanisms of action and implications for novel therapies, *Ophthalmic Res* 29, 354-362.
294. Gemenetzi, M., De Salvo, G., and Lotery, A. J. (2010) Central serous chorioretinopathy: an update on pathogenesis and treatment, *Eye (Lond)* 24, 1743-1756.
295. Bouzas, E. A., Karadimas, P., and Pournaras, C. J. (2002) Central serous chorioretinopathy and glucocorticoids, *Surv Ophthalmol* 47, 431-448.
296. Zhao, M., Celerier, I., Bousquet, E., Jeanny, J. C., Jonet, L., Savoldelli, M., Offret, O., Curan, A., Farman, N., Jaisser, F., and Behar-Cohen, F. (2012) Mineralocorticoid receptor is involved in rat and human ocular chorioretinopathy, *J Clin Invest* 122, 2672-2679.
297. Wickremasinghe, S. S., Rogers, S. L., Gillies, M. C., Zhu, M., and Wong, T. Y. (2008) Retinal vascular caliber changes after intravitreal triamcinolone treatment for diabetic macular edema, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 4707-4711.
298. Ruiz-Moreno, J. M., Montero, J. A., Bayon, A., Rueda, J., and Vidal, M. (2007) Retinal toxicity of intravitreal triamcinolone acetonide at high doses in the rabbit, *Exp Eye Res* 84, 342-348.
299. Macky, T. A., Helmy, D., and El Shazly, N. (2007) Retinal toxicity of triamcinolone's vehicle (benzyl alcohol): an electrophysiologic and electron microscopic study, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245, 817-824.

300. Yi, N. Y., Davis, J. L., Salmon, J. H., and Gilger, B. C. (2008) Ocular distribution and toxicity of intravitreal injection of triamcinolone acetonide in normal equine eyes, *Vet Ophthalmol 11 Suppl 1*, 15-19.
301. Rae, M., Mohamad, A., Price, D., Hadoke, P. W., Walker, B. R., Mason, J. I., Hillier, S. G., and Critchley, H. O. (2009) Cortisol inactivation by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-2 may enhance endometrial angiogenesis via reduced thrombospondin-1 in heavy menstruation, *J Clin Endocrinol Metab 94*, 1443-1450.
302. Greenberger, S., Boscolo, E., Adini, I., Mulliken, J. B., and Bischoff, J. (2010) Corticosteroid suppression of VEGF-A in infantile hemangioma-derived stem cells, *N Engl J Med 362*, 1005-1013.
303. Kluza, E., Yeo, S. Y., Schmid, S., van der Schaft, D. W., Boekhoven, R. W., Schiffelers, R. M., Storm, G., Strijkers, G. J., and Nicolay, K. (2011) Anti-tumor activity of liposomal glucocorticoids: The relevance of liposome-mediated drug delivery, intratumoral localization and systemic activity, *J Control Release 151*, 10-17.
304. Yano, A., Fujii, Y., Iwai, A., Kageyama, Y., and Kihara, K. (2006) Glucocorticoids suppress tumor angiogenesis and in vivo growth of prostate cancer cells, *Clin Cancer Res 12*, 3003-3009.
305. Folkman, J. (1985) Toward an understanding of angiogenesis: search and discovery, *Perspect Biol Med 29*, 10-36.
306. Hadoke, P. W., Iqbal, J., and Walker, B. R. (2009) Therapeutic manipulation of glucocorticoid metabolism in cardiovascular disease, *Br J Pharmacol 156*, 689-712.
307. Weinstein, R. S. (2010) Glucocorticoids, osteocytes, and skeletal fragility: the role of bone vascularity, *Bone 46*, 564-570.
308. Martidis, A., Miller, D. G., Ciulla, T. A., Danis, R. P., and Moorthy, R. S. (1999) Corticosteroids as an antiangiogenic agent for histoplasmosis-related subfoveal choroidal neovascularization, *J Ocul Pharmacol Ther 15*, 425-428.
309. Aziz, K. E., and Wakefield, D. (1996) Modulation of endothelial cell expression of ICAM-1, E-selectin, and VCAM-1 by beta-estradiol, progesterone, and dexamethasone, *Cell Immunol 167*, 79-85.
310. Vinukonda, G., Dummula, K., Malik, S., Hu, F., Thompson, C. I., Csiszar, A., Ungvari, Z., and Ballabh, P. (2010) Effect of prenatal glucocorticoids on cerebral vasculature of the developing brain, *Stroke 41*, 1766-1773.

311. Dot, C., Behar-Cohen, F., BenEzra, D., Doat, M., Jonet, L., May, F., and Jeanny, J. C. (2007) Influence of triamcinolone intravitreal injection on retinochoroidal healing processes, *Exp Eye Res* 84, 1081-1089.
312. McKay, T. L., Gedeon, D. J., Vickerman, M. B., Hylton, A. G., Ribita, D., Olar, H. H., Kaiser, P. K., and Parsons-Wingerter, P. (2008) Selective inhibition of angiogenesis in small blood vessels and decrease in vessel diameter throughout the vascular tree by triamcinolone acetonide, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 1184-1190.
313. Behar-Cohen, F. (2011) [Retinal drug targets], *Ann Pharm Fr* 69, 124-130.
314. Rosenbaum, J. T., McDevitt, H. O., Guss, R. B., and Egbert, P. R. (1980) Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease, *Nature* 286, 611-613.
315. Behar-Cohen, F. F., Parel, J. M., Pouliquen, Y., Thillaye-Goldenberg, B., Goureau, O., Heydolph, S., Courtois, Y., and De Kozak, Y. (1997) Iontophoresis of dexamethasone in the treatment of endotoxin-induced-uveitis in rats, *Exp Eye Res* 65, 533-545.
316. Manning, A. M., and Davis, R. J. (2003) Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold?, *Nat Rev Drug Discov* 2, 554-565.
317. Hirt, L., Badaut, J., Thevenet, J., Granziera, C., Regli, L., Maurer, F., Bonny, C., and Bogousslavsky, J. (2004) D-JNKI1, a cell-penetrating c-Jun-N-terminal kinase inhibitor, protects against cell death in severe cerebral ischemia, *Stroke* 35, 1738-1743.
318. Touchard, E., Kowalczyk, L., Bloquel, C., Naud, M. C., Bigey, P., and Behar-Cohen, F. (2010) The ciliary smooth muscle electrotransfer: basic principles and potential for sustained intraocular production of therapeutic proteins, *J Gene Med* 12, 904-919.
319. El Sanharawi, M., Kowalczyk, L., Touchard, E., Omri, S., de Kozak, Y., and Behar-Cohen, F. (2010) Protein delivery for retinal diseases: from basic considerations to clinical applications, *Progress in retinal and eye research* 29, 443-465.
320. Thakur, A., Kadam, R. S., and Kompella, U. B. (2011) Influence of drug solubility and lipophilicity on transscleral retinal delivery of six corticosteroids, *Drug Metab Dispos* 39, 771-781.
321. Stellato, C. (2004) Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids, *Proc Am Thorac Soc* 1, 255-263.

ANNEXES

ANNEXE 1



Research paper

In vivo characterisation of a novel water-soluble Cyclosporine A prodrug for the treatment of dry eye disease

M. Rodriguez-Aller^a, B. Kaufmann^a, D. Guillarme^a, C. Stella^a, P. Furrer^a, S. Rudaz^a, I. El Zaoui^b, F. Valamanesh^{b,c}, C. Di Tommaso^a, F. Behar-Cohen^{b,d}, J.-L. Veuthey^a, R. Gurny^{a,*}

^aSchool of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, University of Lausanne, Switzerland

^bINSERM, UMRS 872 Team 17, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France

^cFondation A. De Rothschild, 25 Rue Manin, 75019 Paris, France

^dUniversité Paris Descartes, Faculté de médecine, Département d'ophtalmologie, Hôpital Hôtel-Dieu, APHP, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 March 2011

Accepted in revised form 28 November 2011

Available online 3 December 2011

Keywords:

Cyclosporine A

Prodrug

Precorneal kinetic

UHPLC–MS/MS quantification

Ophthalmic formulation

Dry eye

ABSTRACT

Cyclosporine A (CsA) has been demonstrated to be effective for the treatment of a variety of ophthalmological conditions, including ocular surface disorders such as the dry eye disease (DED). Since CsA is characterised by its low water solubility, the development of a topical ophthalmic formulation represents an interesting pharmaceutical question. In the present study, two different strategies to address this challenge were studied and compared: (i) a water-soluble CsA prodrug formulated within an aqueous solution and (ii) a CsA oil-in-water emulsion (Restasis[®], Allergan Inc., Irvine, CA). First, the prodrug formulation was shown to have an excellent ocular tolerance as well as no influence on the basal tear production; maintaining the ocular surface properties remained unchanged. Then, in order to allow in vivo investigations, a specific analytical method based on ultra high pressure liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometer (UHPLC–MS/MS) was developed and optimised to quantify CsA in ocular tissues and fluids. The CsA ocular kinetics in lachrymal fluid for both formulations were found to be similar between 15 min and 48 h. The CsA ocular distribution study evidenced the ability of the prodrug formulation to penetrate into the eye, achieving therapeutically active CsA levels in tissues of both the anterior and posterior segments. In addition, the detailed analysis of the in vivo data using a bicompartamental model pointed out a higher bioavailability and lower elimination rate for CsA when it is generated from the prodrug than after direct application as an emulsion. The interesting in vivo properties displayed by the prodrug solution make it a safe and suitable option for the treatment of DED.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The dry eye disease (DED) includes a broad spectrum of signs and symptoms that makes its definition and classification highly complex. That is one of the reasons why there are various other terms associated with this condition, such as dry eye syndrome, chronic dry eye disease, dysfunctional tear syndrome, keratoconjunctivitis sicca or keratitis sicca [1–4]. The lack of consent regarding the definition and diagnosis of the disorder contributes to the difficulty of evaluating its prevalence and impact on the patients'

life. Nevertheless, a study showed that the impact of the DED on patients' quality of life could be compared with the one of a moderate angina [5], evidencing the importance of developing an appropriate treatment. As a general concept, it has been agreed that DED affects the ocular surface and has an unmistakable correlation with local inflammatory processes, in which the immune T cells and the lachrymal functional unit are highly involved. The inflammatory component of DED is assumed to play a key role in its pathology. It has been reported that some patients continue complaining about eye irritation even after adequate aqueous enhancement treatment [3]. Therefore, the underlying inflammatory process needs serious consideration for effective treatment, putting CsA in the spotlight for this application.

Cyclosporine A (CsA) is an undecapeptide produced by the microorganism *Tolypocladium inflatum* Gams that presents very useful properties for ophthalmic applications [6,7]. CsA has very interesting mechanisms of action that can be valuable in the treatment of DED. For example, CsA binds to cyclophilins and causes an

Abbreviations: CsA, Cyclosporine A; DED, dry eye disease; CLSO, confocal laser scanning ophthalmoscope; UHPLC–MS/MS, ultra high pressure liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometer; d₁₂CsA, deuterated CsA; IS, internal standard; PBS, phosphate buffer solution; CS, calibration standard; STT, Schirmer tear test; bid, *bis in die*.

* Corresponding author. School of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, University of Lausanne, 1211-Geneva-4, Switzerland.

E-mail address: Robert.Gurny@unige.ch (R. Gurny).

inhibition of the calcineurin pathway that results in a suppression of the expression of cytokines genes; this leads to a non-activation of the T cells [8]. CsA is also known to take part in the inhibition of the c-Jun N-terminal kinases (JNK) and p38 signalling pathways involved in the activation of T cells [9]. In addition, CsA participates in the stimulation of apoptosis of the T cells that are already in an activated state [10], and it contributes to the enhancement of the release of a neurotransmitter, substance P, from the sensory nerves directing a stimulating interaction with the parasympathetic nerves [11,12]. Once in contact with the eye, CsA leads to a decrease in inflammation and an increase of the lachrymal production, both effects being highly beneficial for the treatment of DED.

DED is an ocular surface condition; therefore, it would be appropriate to treat the pathological process on a local ocular level by applying a topical ophthalmic formulation. This strategy helps to avoid some severe side effects caused by CsA when applied systemically such as nephrotoxicity, hepatotoxicity or hypertension [13].

Nevertheless, the use of CsA for ocular application represents a challenge regarding its pharmaceutical formulation. CsA is a highly hydrophobic molecule “practically insoluble” in water [14] that is difficult to be formulated in a totally hydrophilic vehicle, which makes its topical delivery into the eye a complicated matter.

Despite many attempts to address this question, only one formulation has been approved by the United States Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of DED in humans to date; it is a CsA oil-in-water emulsion commercialised under the name of Restasis® (Allergan Inc., Irvine, CA).

In the present work, the selected procedure for the formulation of CsA into a topical ocular form was a chemical modification of the active molecule to increase its hydrophilicity. This prodrug approach is based on an ester of CsA carrying a phosphate group as a solubilising moiety, already described in previous studies [15–19]. The chemical structures of CsA and the prodrug are illustrated in Fig. 1. The prodrug, OPPH 088, exhibited a solubility that was approximately 25,000 times higher than CsA in isotonic phosphate buffer solution (PBS) at pH 7 [18]. In addition, OPPH 088 has the property to be quickly biotransformed into CsA once in contact with the ocular surface because of the esterase-like enzymatic activity of the tears [19].

Drug precorneal behaviour and ocular distribution are fundamental factors that strongly condition the bioavailability and effi-

cacy of the formulations. Nevertheless, only little is known about CsA eyedrops’ behaviour once in contact with the eye.

The aim of the present study was to characterise the *in vivo* behaviour of a novel formulation based on OPPH 088, and compare it to the commercial formulation, Restasis. The influence of the formulations on ocular surface properties was evaluated by measuring the corneal damage and basal tear production after their administration. Also, a dedicated UHPLC–MS/MS (ultra high pressure liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometer) analytical method was developed and optimised in order to quantify CsA in ocular tissues and fluids. It allowed the determination of the ocular kinetics of OPPH 088 and Restasis as well as the CsA ocular distribution after prodrug administration. This information provided a basis for a model development and comparison of the formulations.

2. Materials and methods

2.1. Materials

OPPH 088 was synthesised at the Institute of Chemical Sciences and Engineering of the Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (Switzerland) following the procedure described by Wenger et al. [15]. CsA was kindly provided by Dr. Wenger. Deuterated CsA (d_{12} CsA), used as an internal standard (IS), was a gift from Novartis (Basel, Switzerland), and mannitol was purchased from Acros Organics (Belgium). Water was obtained from a Milli-Q Water Purification System from Millipore (Bedford, MA, USA). Acetic acid and methanol were of ULC/MS grade and were purchased from Biosolve (Valkenswaard, Netherlands). Isopropanol was provided by Sigma–Fluka (Buchs, Switzerland).

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of the prodrug solution

A 0.066% w/v OPPH 088 aqueous formulation was prepared at a concentration equivalent to 0.050% w/v CsA using an aqueous 5% w/v mannitol solution as a vehicle. The pH was measured (Metrohm, Herisau, Switzerland) and adjusted to 7 with 1 N NaOH, and the isotonicity was verified (Vapour Pressure Osmometer 5500, Wescor, Logan, Utah, USA) prior to the experiment. The solution was filtered through a 0.22 μ m polyvinylidene fluoride membrane (Millipore, Cork, Ireland) and kept in an appropriate eyedrop container until use.

2.2.2. Analytical method

2.2.2.1. UHPLC–MS/MS instrumentation. Analyses were performed on a Waters Acquity ultra performance liquid chromatograph (UPLC) system hyphenated with a Waters TQD triple quadrupole mass spectrometer fitted with a Z-spray electrospray ionisation source (Waters, Milford, MA, USA).

The chromatographic system included a binary solvent manager with a maximum delivery flow rate of 2 mL/min, a sample manager with an injection loop volume of 2 μ L (full loop injection), and a column oven set at 60 °C. The chromatographic column was a Waters Acquity BEH C18 (50 \times 2.1 mm I.D., 1.7 μ m). Dwell volume of the UPLC–MS/MS configuration was estimated at 100 μ L with a 2 μ L injection loop. Chromatographic conditions for the separation were as follow: the analysis was carried out in the gradient mode at a flow rate of 600 μ L/min (without splitting). The mobile phase consists of a mixture of water with 0.02% v/v acetic acid (A) and methanol with 0.02% v/v acetic acid (B). A linear gradient from 60% to 100% B was applied for 3 min, followed by a reequilibrating step of 1 min (corresponding to 5 column dead volumes). After each analysis, the injection system was washed in order to avoid

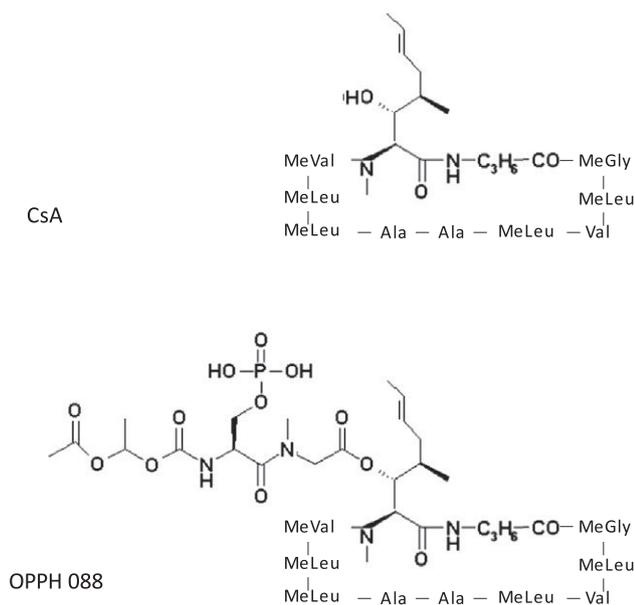


Fig. 1. Chemical structures of CsA and OPPH 088.

any CsA adsorption onto the surface; 1000 μL of pure isopropanol were used as strong wash, and 2000 μL of pure methanol as weak wash. The sample manager temperature was maintained at 4 °C during the time of analysis to avoid transformation and degradation.

The TQD instrument possessed an upper mass limit of m/z 2000. The ESCi[®] ionisation source was used in the ESI positive mode, and selected reaction monitoring (SRM) was performed, using the pseudo-molecular ion of each compound as the precursor ion and the most intense fragment. The use of an internal standard for the quantification of CsA in ocular tissues and fluids was highly beneficial to minimise the variability of the results. The selected molecule to be used as a reference was a 12 times deuterated CsA ($d_{12}\text{CsA}$) that has the same chromatographic behaviour than CsA with a higher m/z . The ratio between signals of CsA and $d_{12}\text{CsA}$ was the basis for quantification. Collision energies and cone voltages were tuned by infusing each compound individually at 1 $\mu\text{g/mL}$ using a flow rate of 600 $\mu\text{L/min}$. Optimal values were 65 V for the cone voltage and 63 eV for the collision energy. The pseudo-molecular parent ion and fragment corresponding to CsA have an m/z of 1224.7 and 1112.4, respectively; concerning $d_{12}\text{CsA}$, the parent ion has an m/z of 1236.7 and its daughter ion of 1124.4. Nitrogen was used as the drying gas and argon as the collision gas. The capillary voltage and the source extractor voltages were set at +4 kV and +3 V, respectively. The source temperature was maintained at 140 °C, the desolvation gas temperature and flow at 450 °C and 600 L/h, respectively, and the cone gas flow at 50 L/h. The collision gas flow was set to 0.2 mL/min of argon, and the entrance and exit potentials were adjusted to 1 and 0.5 V, respectively. Finally, the inter-channel delay was set to 5 ms, and dwell time was set to 200 ms for CsA and 20 ms for $d_{12}\text{CsA}$ to maintain enough data points across the narrow peaks produced by the UHPLC–MS/MS instrument. The high mass resolution was adjusted to 10 to improve the sensitivity of the method. Data acquisition, data handling and instrument control were performed by Masslynx v4.1 Software (Waters, Milford, MA, USA).

2.2.2.2. Solutions for calibration. Calibration standards (CSs) included samples containing known concentrations of analytes. CSs were prepared in an independent way. A series of eleven concentration levels were selected corresponding to the wide range of concentrations expected in biological samples. CSs were replicated three times and independently prepared on different days.

For the precorneal kinetic study, tears from 8 rabbits were collected and pooled to obtain blank tear fluid that was subsequently spiked with 0.1 $\mu\text{g/mL}$ $d_{12}\text{CsA}$ as an internal standard, and the drug concentrations was varied at: 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2 and 0.1 $\mu\text{g/mL}$ and 5, 2, 1 and 0.5 ng/mL. For the ocular penetration study, the same CsA and $d_{12}\text{CsA}$ concentrations were used.

2.2.2.3. Analytical method for CsA quantification at kinetic time points after 24h. Two different analytical situations were defined in the determination of the kinetic profile according to the amount of CsA expected in the biological samples: during the kinetic experiment, the highest levels of CsA were expected for the time points taken earlier than 3 h after administration of the drug. As a consequence, the initially developed analytical method was modified to address the specific challenges for the quantification of the active molecule in the samples collected more than 3 h after the eyedrop administration.

The modifications focus on two parameters of the method: (i) dwell time for CsA was raised from 0.2 to 1 s, which allowed a higher sensitivity and (ii) calibration was performed with solutions containing 0.1 $\mu\text{g/mL}$ of $d_{12}\text{CsA}$ and lower concentrations of CsA: 0.2, 0.1, 0.05, 0.02 and 0.01 ng/mL. These results should be considered as pseudo-quantitative.

2.2.3. Animals

2.2.3.1. Rabbits for ocular tolerance evaluation, basal lachrymal production measurements and kinetic study. Female albinos New Zealand rabbits weighing approximately 4–5 kg (University Medical Center, Geneva, Switzerland) were used in this study. Animals were individually housed in stainless steel cages and maintained in a 12 h light/dark cycle at 19 ± 1 °C. They were allowed water and food ad libitum. All animals were healthy and free of clinically observable ocular abnormalities throughout the study. Animals were not sacrificed at the end of the experiments and remained healthy and with no observable ocular signs after the studies. All experiments were performed in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) statement for the use of animals in ophthalmic and vision research and were approved by the local veterinary authority for animal experimentation.

2.2.3.2. Rats for ocular distribution study. Eight-week-old female Lewis rats weighing 150–200 g were used in this study. At the end of the study, rats were sacrificed using CO_2 . All experiments were performed in accordance with the ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) statement for the use of animals in ophthalmic and vision research and were approved by the European Committee Directives for animal experimentation.

2.2.4. Ocular tolerance evaluation protocol

Twenty-five microlitres of the solution to be tested were instilled to the cornea of the right eye of a rabbit four times a day, for a period of 3 days and once on the fourth day just before observation of the cornea. After the last administration, rabbits were placed on a high-adjustable trolley in front of a camera head. A volume of 25 μL of a 0.5% w/v sodium fluorescein sterile isotonic solution was applied to allow the injured areas to be selectively marked. The eye was then rinsed for 1 min with 0.9% w/v sterile NaCl. Finally, the cornea was observed with a confocal laser scanning ophthalmoscope (CLSO[®] Zeiss, Oberkochen, Germany), which was modified by the addition of a set of lenses to view the cornea instead of the retina [20]. An argon ion laser operating at a 488 nm wavelength was used as the excitation light source. The fluorescence signal was detected by a photomultiplier. Images were obtained using an Epiplan-Neofluar 2.5 \times /0.075 NA objective lens (Zeiss, Oberkochen, Germany). Optical sectioning was performed parallel to the corneal surface at 16 equidistant focal planes; the focus shifting ranged from 0 to 470 μm covered the entire corneal thickness. The images were displayed on a digital video monitor. An image processing system (Analysis SIS, Münster, Germany) allowed the calculation of the total surface of the fluorescent zones, which indicated injured areas. Each formulation was tested on six rabbits.

Student's *t* test was used to compare the corneal damage. A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

2.2.5. Basal lachrymal production measurements

The Schirmer test was used to measure basal tear production. The evaluation was performed on 6 rabbits for each formulation; Restasis and the prodrug solution. A first sample was taken before drug administration to evaluate the tear basal production at time zero. After the administration of 25 μL of one or the other formulation, samples were collected at: 1, 2, 4, 6, 24 and 48 h. The sample collection was preceded by a topical anaesthesia with one drop of 0.4% oxybuprocaine solution; 5 min later, the Schirmer test strip was inserted into the cul-the-sac and left in place for 5 min. The height of absorbed lachrymal fluid was measured in mm and reported in STT (Schirmer tear test). Student's *t* test was used to compare the experimental results, and *p* values of less than 0.05 were considered statistically significant.

2.2.6. Ocular distribution study protocol

The ocular distribution of CsA was evaluated after the administration of the prodrug solution bid (twice a day) during 5 days on 6 rats. At the end of the experiment, animals were sacrificed with CO₂, eyes were enucleated and the cornea, conjunctiva, aqueous humour, iris-ciliary body, vitreous humour and retina were collected and stored at –80 °C in protected vial. Prior to analyses, the tissue samples were thawed at room temperature, weighted, manually grinded, introduced in a vial containing 200 µL of methanol along with 0.1 µg/mL d₁₂CsA and stirred over night. The day after, samples were centrifuged, and the supernatants were analysed by UHPLC–MS/MS.

2.2.7. Kinetic evaluation

Normal nasolachrymal drainage was verified 3 days before the experiment by applying one drop of fluorescein solution (0.5% w/v in phosphate buffered solution at pH 7). Rabbits were divided into two groups according to the tested eyedrop formulation: 6 rabbits for Restasis and others 6 rabbits for OPPH 088. The experiment began with the administration of 25 µL of the appropriate formulation in the right eye of six non-anaesthetised rabbits. Tear fluid samples were collected from the lower marginal strip using 2 µL disposable glass microcapillary tubes (Microcaps Drummond, Thomas Scientific, New Jersey). A first sample was taken before administering the drug to verify the absence of CsA before the start of the experiment. After the administration of the formulation, samples were collected at different times: 1, 3, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180 min and at 24 and 48 h. After collection, the tear fluid sample was gently blown out of the capillary into a vial containing 50 µL of methanol along with 0.1 µg/mL d₁₂CsA. The vial was gently vortexed to allow the methanol to stop the conversion of the prodrug by denaturing the proteins involved in the reaction. The vials were analysed into the UHPLC–MS/MS system, and CsA concentrations were determined. The statistical non-parametrical Mann–Whitney *U*-test was chosen to compare the kinetics of the studied formulations. A bicompartiment model was developed based on the experimental results.

3. Results

3.1. Ocular tolerance

The percentages of corneal damage experimentally observed after the administration of Restasis and OPPH 088 formulations are shown in Fig. 2 along with the value for an isotonic sterile saline solution.

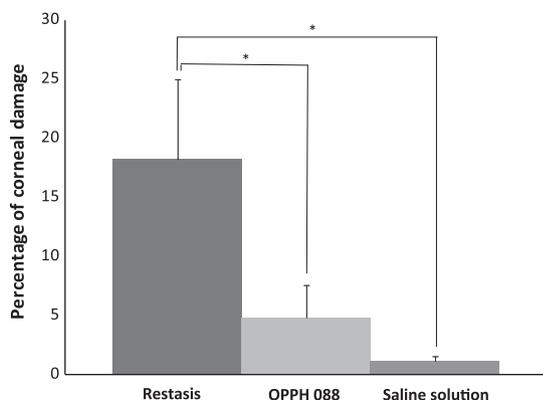


Fig. 2. Percentage of corneal damage after instillation of Restasis (■), OPPH 088 (▒) and saline solution (■) (the latter being already reported in a previous study [20]). Mean ± SD, *n* = 6, *significantly different according to Student's *t*-test.

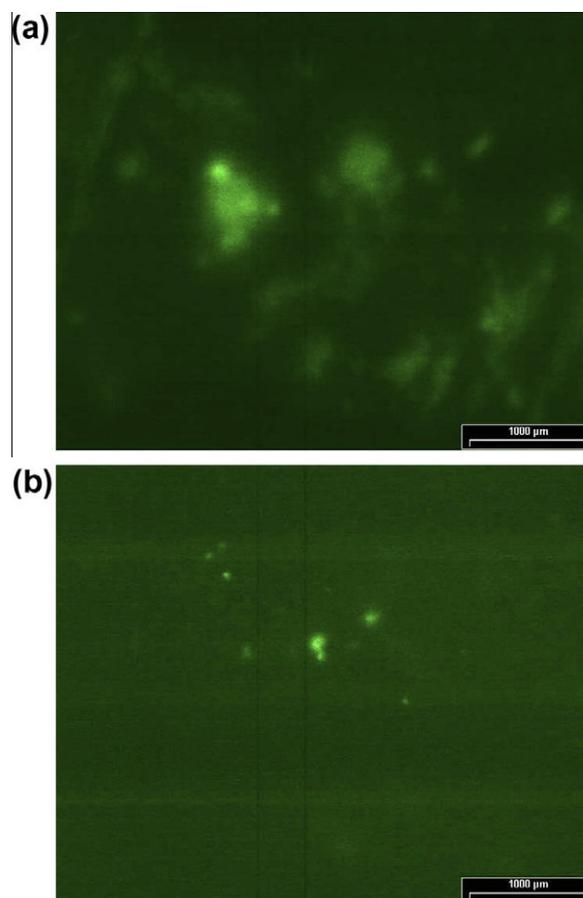


Fig. 3. Representative pictures of corneal injury caused by (a) Restasis and (b) OPPH 088. The damaged corneal cells are permeable to the fluorescein staining and are visible as fluorescent areas. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

ine solution determined during a previous study [20]. The corneal injury surface evaluated after the administration of OPPH 088 was $4.84 \pm 2.72\%$ of the observed area, while for Restasis, it was $18.20 \pm 6.82\%$; the value for a sterile saline solution was $1.15 \pm 0.35\%$.

According to Student's *t* test, the fluorescent area observed for Restasis was significantly different from that of OPPH 088 or saline solution. Restasis presented the highest corneal injury. Fig. 3 clearly highlights the difference between the corneal damage caused by Restasis compared to that by OPPH 088. In addition, the statistical analysis of the values obtained with OPPH 088 compared to those of the sterile saline solution showed no significant differences between the solutions.

3.2. Basal lachrymal secretion

The Schirmer test was carried out to assess the influence of the formulations on the basal tear production. Fig. 4 illustrates the experimental data. The basal mean values for all animals before drug application were between 10.6 and 12.2 mm, which are represented by the dashed line area in the figure. Data from the two rabbit groups do not significantly differ; values after administration of the formulations and baseline are either significantly different. Nevertheless, it can be noticed that rabbits treated with the prodrug solution have values above baseline or included in the baseline area, while the Restasis group presents more fluctuations below the baseline area.

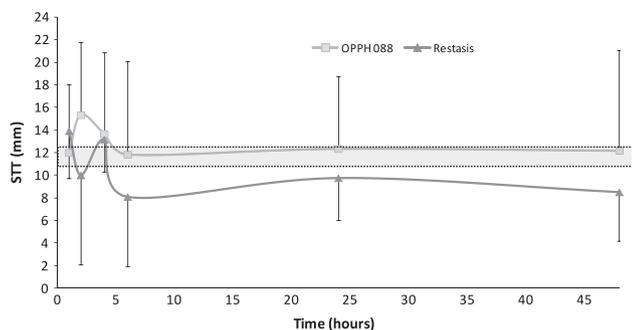


Fig. 4. Basal lachrymal production after a single instillation of Restasis and the prodrug formulation ($n = 6$) reported in STT (Schirmer tear test) in mm of wetted strip. The area with dashed line indicates the basal tear production prior to the formulation application.

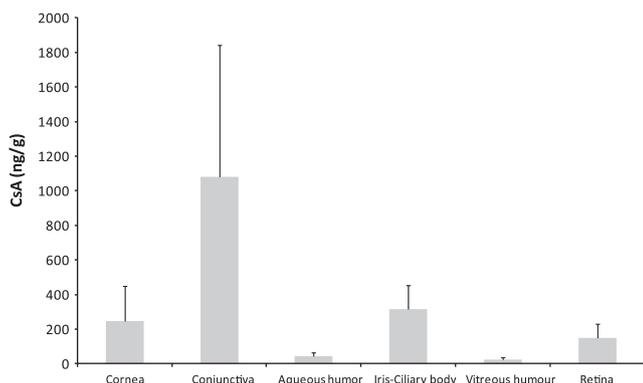


Fig. 5. CsA ocular distribution after topical application of OPPH 088 formulation bid for 5 days ($n = 6$).

3.3. Ocular distribution

The prodrug solution was administered bid during 5 days on 6 rats, and CsA levels were determined in ocular tissues and fluids. The average CsA concentrations were estimated at 247 ± 203 ng/g for the cornea, 1082 ± 761 ng/g for the conjunctiva, 45 ± 18 ng/g for the aqueous humour, 315 ± 139 ng/g for the iris-ciliary body, 24 ± 13 ng/g vitreous humour and 149 ± 83 ng/g for the retina, as illustrated in Fig. 5. The anterior and posterior structures of the eye were exposed to CsA, the highest levels being located in the anterior chamber.

3.4. In vivo precorneal kinetics

3.4.1. Kinetic profiles

Fig. 6 illustrates the CsA tear fluid kinetic profile after administration of Restasis up to 180 min. Different kinetic phases were identified. The first phase was characterised by the rapid and marked decrease of CsA levels observed during the first 20 min. The second phase was characterised by a plateau from 20 to 180 min. Analysis of the tear samples for longer time points exhibited concentrations of CsA of 5 ± 1 ng/mL and 2 ± 1 ng/mL for 24 and 48 h, respectively. The second phase was characterised by sustained drug concentrations in tears.

Fig. 7 presents the CsA tear fluid kinetic profile after administration of OPPH 088 formulation for the first 180 min. OPPH 088 appeared to have a very different general trend compared to Restasis, especially concerning the first time points and the maximum CsA concentrations.

A supplementary phase was observed in addition to the ones already identified for Restasis. In fact, the profile showed a marked

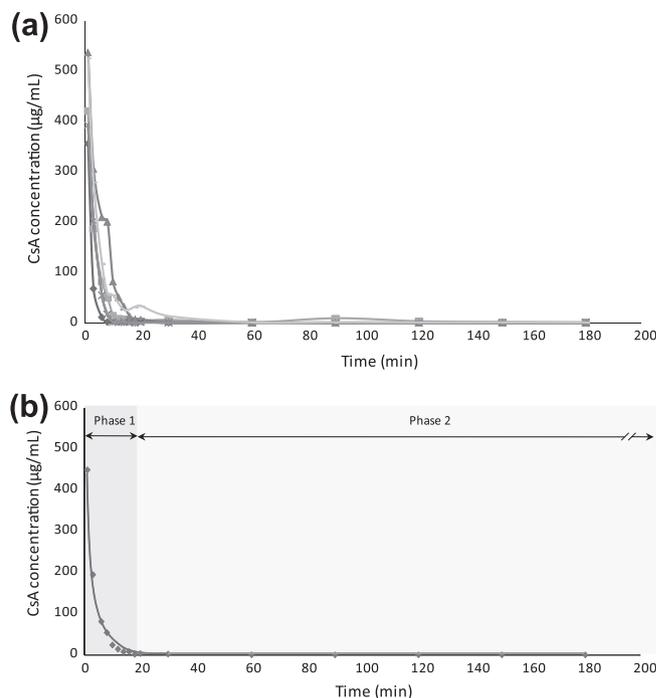


Fig. 6. CsA tear fluid kinetic profile after instillation of Restasis (a) for six rabbits and (b) based on median values ($n = 6$). The kinetic phases are represented in (b).

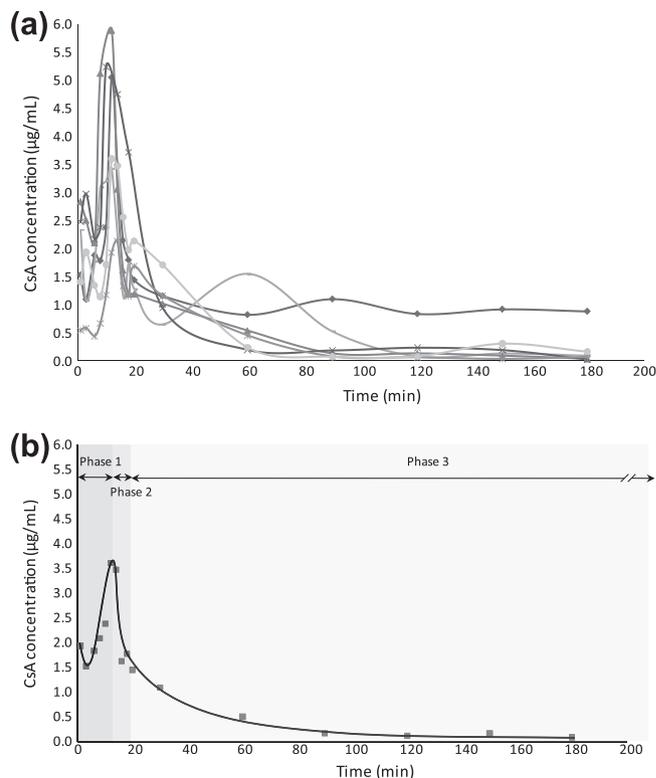


Fig. 7. CsA tear fluid kinetic profile after instillation of OPPH 088 formulation (a) for six rabbits and (b) based on median values ($n = 6$). The kinetic phases are represented in (b).

increase of CsA during the first 15 min. This corresponded to the first biotransformation step required in order to allow CsA to be released into the tear film from the prodrug formulation. This first phase was linked to the formulation characteristics and explained the specificity of the profile. Later, a rapid decrease in CsA tear

levels was observed and defined as the second phase. A plateau was visible up to 3 h. Furthermore, the analysis of the lachrymal fluid samples after 24 and 48 h showed levels of CsA of 5 ± 1 ng/mL and 2 ± 1 ng/mL, respectively. The sustained concentrations of CsA observed with Restasis were also seen for OPPH 088, constituting the third phase of its kinetic profile.

In addition, maximum CsA concentration in tears was approximately 100 times higher for Restasis than the one assessed for OPPH 088 formulation, which was expected as in the case of Restasis CsA was directly applied on the surface of the eye.

3.4.2. Statistical analysis and comparison

A non-parametrical method was selected for this study, assuming that the distribution of in vivo CsA concentrations for each time point was not necessarily Gaussian. Hence, the kinetic profiles were summarised with median values for each time point, and the Mann–Whitney statistical *U*-test was chosen to analyse the differences between the kinetics of the studied formulations. Thus, Figs. 6 and 7 show two sets of data: (a) for the six rabbits and (b) the median profile.

The major cause of disparities between the profiles was directly linked to the constitution of the formulations themselves. The observed differences during the first 15 min were linked to the nature of the formulations and other factors such as, for example, the ocular protective mechanisms or the enzymatic biotransformation specific to OPPH 088. Thus, an appropriate comparison can only be made if this variability factor is avoided. Consequently, the time points taken before 15 min were discarded from comparison, as illustrated in Fig. 8.

No statistically significant differences were found for the time points between 15 min and 48 h when applying the *U*-test to the two rabbit groups.

Therefore, the in vivo behaviours of both tested formulations were considered equivalent regarding CsA levels in tears between 15 min and 48 h.

3.5. Model development

The development of a model based on the experimental data can be of great interest for a deeper understanding of the in vivo behaviour of each formulation, particularly of their elimination.

A two-compartment model was selected based on the above presented results, and the fact that the experimental kinetic curves clearly showed a profile with, at least, two phases with different linear regression constants. The central compartment was defined as the tear fluid (in which the measurements were performed dur-

ing the kinetic evaluation); the peripheral one was not precisely physically delimited and included the other structures, tissues and fluids that could interact with CsA.

The bicompartmental equation took into account two main phenomena; the distribution and elimination of CsA from the tear fluid [21].

The model used for the Restasis formulation was based on the following equation:

$$C = A_0 e^{-\alpha t} + B_0 e^{-\beta t} \quad (1)$$

where A_0 , B_0 , α and β were macroconstants for the hybrid disposition processes and were determined according to the method of residuals. From these macroconstants, the microconstant for the pure elimination process was calculated using the following equation:

$$K_{el} = \frac{\alpha\beta(A_0 + B_0)}{A_0\beta + B_0\alpha} \quad (2)$$

For the formulation containing OPPH 088, the additional biotransformation step had to be considered. The model equation was written as it follows:

$$C = A_0 e^{-\alpha t} + B_0 e^{-\beta t} + P_0 e^{-\gamma t} \quad (3)$$

where A_0 , B_0 , P_0 , α , β and γ are macroconstants for the hybrid processes that were determined according to the method of residuals. The microconstant for the pure elimination process was calculated using the following relationship:

$$K_{el} = \frac{\alpha\beta\gamma(A_0 + B_0 + P_0)}{A_0\beta\gamma + B_0\alpha\gamma + P_0\alpha\beta} \quad (4)$$

The β elimination half-life was calculated as showed in Eq. (5):

$$t_{1/2\beta} = \frac{0.693}{\beta} \quad (5)$$

The coefficients of determination, r^2 , for the developed models were 0.9452 for Restasis and 0.9643 for OPPH 088.

According to the above presented equations, the values of the elimination constants were 0.2193 min^{-1} for Restasis and 0.0160 min^{-1} for OPPH 088. The Restasis elimination constant was more than ten times higher than for the prodrug regarding CsA concentration in tears. The β elimination half-life values were 32 min for Restasis and 87 min for OPPH 088; approximately three times lower for the commercial emulsion than for the prodrug. These results suggest a higher CsA elimination process with Restasis than with OPPH 088 formulation.

Model characteristics are summarised in Table 1.

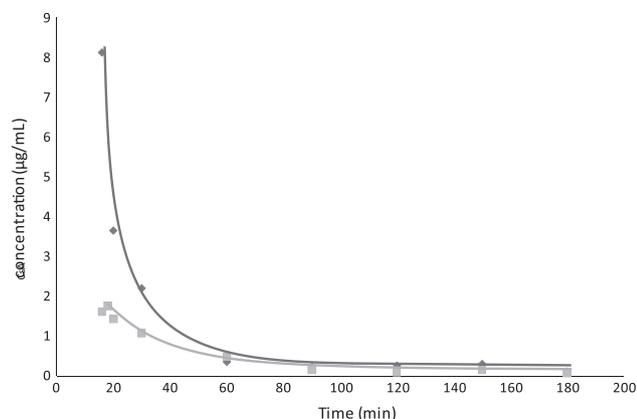


Fig. 8. Restasis (◆) and OPPH 088 (■) kinetic profiles between 15 and 180 min based on median values ($n = 6$).

Table 1

Bicompartment model characteristics for Restasis and OPPH 088. In (a) are shown the bicompartment model equations where A_0 , B_0 , P_0 , α , β and γ are macroconstants for the hybrid processes that were determined according to the method of residuals, in (b) the elimination constant equation and values, in (c) the β elimination half-life equation and value and in (d) the coefficient of determination (r^2) values.

	Restasis	OPPH 088
(a) Bicompartment model equation	$C = A_0 e^{-\alpha t} + B_0 e^{-\beta t}$	$C = A_0 e^{-\alpha t} + B_0 e^{-\beta t} + P_0 e^{-\gamma t}$
(b) Elimination constant	Equation	$K_{el} = \frac{\alpha\beta(A_0 + B_0)}{A_0\beta + B_0\alpha}$
	Value	0.2193 min^{-1}
(c) β Elimination half-life	Equation	$t_{1/2\beta} = \frac{0.693}{\beta}$
	Value	32 min
(d) Coefficient of determination (r^2) value	0.9452	0.9643

4. Discussion

The possible alteration of the ocular surface was the first concern when developing a novel ocular formulation. Additionally, it was a key factor that had to be evaluated prior to the kinetic and distribution studies since it could influence the experimental results. The confocal microscopy technique seemed to be an appropriate method for the objective and sensitive evaluation of the *in vivo* ocular irritation induced by topical ophthalmic formulations, as it has been demonstrated by previous studies [20,22]. In addition, it is a simple and non-invasive procedure. As expected, the experimental results demonstrated that the two tested preparations had a good ocular tolerance (corneal damage lower than 25%) according to the classification established by Kälén [23]. Restasis has been approved by the FDA for human use; therefore, it was not surprising that no important corneal damage was determined. This result was consistent with previous *in vitro* and *in vivo* studies where no tolerability problems were evidenced [24–27]. Nevertheless, the slightly higher fluorescence observed with Restasis compared to the other formulations may be explained by the presence of surfactants, required for the oil-in-water emulsion, that act as detergents [20]. The percentage of corneal damage assessed with the saline solution is representative of the normal physiological desquamation of the surface of the rabbit eye [28]. The assessed fluorescent area for OPPH 088 did not significantly differ from the saline preparation, clearly demonstrating the excellent ocular tolerance of the OPPH 088 formulation. Moreover, the prodrug formulation is expected to exhibit an excellent ocular tolerance in humans also, as human eyes are less sensitive to ocular irritation than rabbits [29]. On the other hand, the Schirmer test demonstrated that neither the prodrug formulation nor Restasis had any negative effect on basal tear production of healthy animals. Both corneal damage assessment and Schirmer test clearly demonstrated that the formulations had no negative effect on the ocular surface properties. In addition, the precorneal behaviour and ocular distribution studies were not expected to be influenced by any corneal irritation or any variation of the lachrymal fluid production.

Once the ocular tolerance of the formulation was found to be excellent, the question of the *in vivo* behaviour and efficacy of the prodrug solution could be addressed. The precorneal behaviour of both formulations as well as the ocular CsA distribution following the prodrug administration were evaluated based on the CsA quantification on ocular tissues and fluids. A specific UHPLC–MS/MS method was developed to address different analytical challenges: (i) the low volume and weight of the biological fluids and tissues (2 μL of tear fluid or different parts of the rat eye), (ii) the low CsA levels expected in the samples to be analysed, (iii) the presence of very close chemical structures in OPPH 088 samples coming from the biotransformation of the prodrug into CsA, (iv) the potential interference of the biological matrices and (v) the high number of samples to be analysed. The UHPLC system fulfilled the analytical requirements regarding the high throughput (analysis time of 3 min) as well as the high robustness (variation of the retention time <1%), allowing the use of an automated quantitative procedure. In addition, the inherent properties of the tandem mass spectrometric detection provided the required elevated sensitivity (LOQ of 2 ng/mL) and high selectivity (ensuring no interferences from close chemical structures coming from the biotransformation of OPPH 088 into CsA or components from the matrix). Moreover, the use of a last generation MS/MS instrument was highly beneficial in order to allow a sufficient number of data points across the CsA narrow peak for an accurate quantification of CsA within the short analysis time provided by the UHPLC system. Finally, the systematic addition of an internal standard, $d_{12}\text{CsA}$, to the samples

ensured the correction of the possible variability during the ionisation process [30,31]. The optimised UHPLC–MS/MS method met the analytical needs for the *in vivo* investigations and displayed interesting characteristics due to the high throughput and high sensitivity.

After the topical administration of the drug, CsA was distributed from the precorneal area between the ocular structures according to its partition coefficient [26]. Thus, the quantification of CsA in the lachrymal fluid provided an overview of the precorneal ongoing processes after the administration of the drug, while the determination of CsA levels in different ocular tissues allowed the evaluation of the penetration and therapeutic effect of the drug. A precorneal *in vivo* kinetic was selected primarily because the mechanism of action of the CsA in the dry eye disease is linked to the precorneal area [3,26,27] and because it is a well established, non-invasive *in vivo* procedure [32,33]. The ocular distribution experiment was necessary in order to evaluate the therapeutic effect obtained after OPPH 088 administration since there is no established standard objective test [1,2] neither an accepted animal model for the evaluation of DED [34]. Furthermore, the rabbit and rat animal models are well characterised and commonly used for ocular investigations [17,26,34–36].

The ocular distribution evaluation showed the ability of the prodrug to achieve active CsA concentrations (i.e. between 50 and 300 ng/g of tissue [37]) in all the studied ocular tissues; cornea, conjunctiva, iris-ciliary body and retina. These results demonstrated the deep ocular penetration obtained with OPPH 088 and its capacity to lead to therapeutic effect in both the anterior and posterior segments of the eye. On the contrary, similar ocular distribution studies performed with Restasis [38] showed lower CsA levels in all ocular tissues compared to the prodrug solution; CsA concentrations after the emulsion application being orders of magnitude below the therapeutic range. The comparison of the presented results with a former study performed with Restasis in rabbits and dogs [26] showed that the prodrug solution achieved higher concentrations in the whole eye, except for the cornea where both Restasis and the prodrug formulation lead to active CsA levels. Thus, the prodrug solution clearly showed a better performance in achieving pharmacologically active CsA levels in the ocular structures compared with Restasis, highlighting its higher penetration capacity.

The target areas for the treatment of DED are located in the anterior segment of the eye and are in direct contact with the lachrymal fluid from where the CsA was redistributed depending on its affinity and bioavailability towards them. The conjunctiva is highly involved in the superficial ophthalmic inflammation reported in DED patients. The above presented ocular distribution results showed that CsA coming from the prodrug solution achieves its maximum concentration in the conjunctival tissue, being highly beneficial for the treatment of the DED. In contrast, CsA delivered from a lipophilic vehicle does not preferably penetrate into that structure [26,38,39]. Lachrymal glands are susceptible to an accumulation of CsA because they have specific transporters that retrieve selectively the peptide from the surrounding environment [26,40–42]. This action could also contribute to the therapeutic effect of the drug. It has been suggested in numerous studies that the cornea plays an important role in topical ophthalmic treatments, particularly in the case of CsA formulations where the active molecule can accumulate in the corneal epithelial cells, that can be considered a lipophilic compartment acting as a reservoir [17,26,43–46]. The transport of CsA into the cornea was mainly caused by its partitioning between the highly hydrophilic lachrymal fluid and the lipophilic corneal epithelial cells, therefore leading to an accumulation following the administration. The posterior redistribution and release of the drug into the tear film could be

explained by the presence of specific active CsA transporters that cause a drug efflux from the cornea into the lachrymal compartment [43]. Another explanation could be that the continuous clearance of CsA from the eye surface displaced the equilibrium in favour of the tear fluid. In the case of the prodrug, the CsA located in the conjunctiva could also undergo the same redistribution processes. The redistribution phenomenon was only relevant for longer time points because during the first few minutes after the administration, there was a saturation of CsA in tears that makes the passive diffusion predominant. The accumulation of CsA followed by the redistribution is consistent with the measured CsA levels in tears for both formulations until 48 h (Phase 2 for Restasis and Phase 3 for OPFH 088).

According to the postulated CsA distribution mechanism, the cornea plays a key role in the kinetics acting as a CsA reservoir. Additionally, in the case of the prodrug, the conjunctiva could also take part in the phenomenon.

The kinetics could be correlated with the mentioned physiological characteristics, and some hypotheses can be made to explain their profiles. In the case of Restasis, the first phase of the kinetic profile can be related to the predominance of a strong and rapid precorneal drug loss linked to the interaction of CsA with the ocular structures and to the stimulation of the specific protective mechanisms of the eye after the administration of the eyedrop. The second phase can be explained by the establishment of equilibrium in the CsA distribution, which is due to the reservoir effect postulated from the corneal epithelium. The same phenomena took place for the kinetics of OPFH 088; however, it was essential for the prodrug to undergo an enzymatic biotransformation prior to the appearance of CsA in the tear fluid. The first phase represented a mixture of the precorneal loss of OPFH 088 and CsA, and the gradual biotransformation of the prodrug into CsA directly in the tear fluid. The increase of CsA levels during the first minutes strongly suggested that the predominant mechanism in that phase was the biotransformation of OPFH 088. The second phase of the kinetic of OPFH 088 was considered equivalent to the first phase of Restasis, which corresponded with a predominant loss of drug from the surface of the eye. The third phase is characterised by sustained drug concentrations in tears suggesting a redistribution of the drug.

Despite the major disparities exposed between the general profiles, the statistical analysis based on the Mann–Whitney *U*-test for time points starting from the 15 min mark showed no significant difference between the kinetics of Restasis and OPFH 088. Both formulations induced equivalent CsA levels in the tear fluid between 15 min and 48 h after topical ophthalmic application.

Nevertheless, it has to be noted that the quantitative approach presented is restricted to the limitations of the technique used. A more global and qualitative view can be of interest to better understand the *in vivo* behaviour of the studied formulations. As the elimination of CsA is a continuous and subtle phenomenon, its further analysis was only possible through the presented model that allows to unveil interesting information (which would have been unnoticed with the quantitative approach). A two-compartment model centred on the tear fluid was appropriate since it reflects the physiological situation [35,46], and it is in accordance with the experimental results.

The obtained values for the elimination constant and the β half-life clearly pointed out a higher ocular elimination for CsA when administered with the emulsion compared to the prodrug formulation. This result is consistent with the previously presented data for Restasis (higher corneal damage and lower CsA levels in ocular tissues). The difference observed in the elimination of the studied formulations could be linked to their nature; oil-in-water emulsion for Restasis versus a totally aqueous solution for OPFH 088.

It has been demonstrated that the nature of the formulation has a key influence on CsA elimination, availability and efficacy [26,27,47]. On the one hand, the elimination could be enhanced by the stimulation of the protective mechanisms of the eye. For Restasis, some reported adverse effects such as ocular burning, discharge, foreign body sensation, redness or epiphora [48] could be linked to the stimulation of the protective mechanisms of the eye that could reinforce the elimination. Previous studies showed that the ocular application of a lipophilic vehicle is not without consequences [49–51]. In the case of OPFH 088, the aqueous vehicle contributed to a lower foreign body reaction and a moderated inducement of protection mechanisms (which was consistent with the previously presented ocular tolerance results). Thus, OPFH 088 formulation could lead to a lower patient's discomfort level. On the other hand, the miscibility of the formulations with the lachrymal fluid has also to be considered. To obtain a therapeutic effect with Restasis, CsA must leave the lipophilic fraction of the emulsion to be released into the lachrymal fluid and reach the target tissues. Nevertheless, the partition coefficient of CsA between tears and its lipophilic carrier was not favourable. CsA had a higher affinity for the oily phase of the emulsion that limited its release and availability, as former studies demonstrated [47]. In addition, the lipophilic fraction of Restasis was more compatible with the superficial lipid layer of the tear film, which facilitated its elimination. In the case of OPFH 088, the prodrug was easily distributed within the lachrymal fluid layer, where the enzymatic biotransformation occurred, resulting in the release of CsA directly into the tear fluid. The generated CsA is surrounded by the lachrymal hydrophilic environment from where it had a higher tendency to interact with ocular tissues. The CsA release and bioavailability are then reinforced. This postulated higher CsA availability for OPFH 088 formulation is in accordance with the previously described lower elimination and higher ocular tissues levels.

Despite the fact that the same active molecule was involved in both formulations, the implicated mechanisms were different; OPFH 088 aqueous formulation could lead to higher penetration, higher ocular tissue concentrations, lower elimination, higher availability and higher efficacy of CsA.

5. Conclusion

This investigation demonstrated the excellent ocular tolerance of the OPFH 088 formulation and gives considerable insight on the *in vivo* behaviour of the studied ophthalmic formulations. On the one hand, it demonstrated the ability of OPFH 088 formulation to achieve therapeutically active CsA levels in both the anterior and posterior segments of the eye, highlighting higher CsA tissue levels and penetration capacity compared to Restasis. On the other hand, it evidenced a lower elimination and higher availability for CsA when generated from the prodrug than after direct application with the emulsion. Therefore, it can be suggested that the use of OPFH 088 represents a safe and suitable option for the treatment of DED. In addition, OPFH 088 has some interesting advantages such as an increased patient comfort and higher compliance, which are of major importance since DED requires long periods of treatment.

Ongoing *in vivo* investigations will allow a deeper understanding of the behaviour of CsA-based topical ophthalmic formulations.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the financial support from Ophthalmopharma (Sarnen, Switzerland). The animal experiments have been made with the help of Catherine Siegfried. The

authors would also like to thank Dr. Raul Nicoli for his help with analytical questions.

References

- [1] M.A. Lemp, Advances in understanding and managing dry eye disease, *Am. J. Ophthalmol.* 146 (2008) 350–356.
- [2] H.D. Perry, Dry eye disease: pathophysiology, classification, and diagnosis, *Am. J. Manag. Care* 14 (2008) S79–87.
- [3] K. Gumus, D.H. Cavanagh, The role of inflammation and antiinflammation therapies in keratoconjunctivitis sicca, *Clin. Ophthalmol.* 3 (2009) 57–67.
- [4] M.E. Johnson, P.J. Murphy, Changes in the tear film and ocular surface from dry eye syndrome, *Prog. Retin. Eye Res.* 23 (2004) 449–474.
- [5] R.M. Schiffman, J.G. Walt, G. Jacobsen, J.J. Doyle, G. Lebovics, W. Sumner, Utility assessment among patients with dry eye disease, *Ophthalmology* 110 (2003) 1412–1419.
- [6] F. Lallemand, O. Felt-Baeyens, K. Besseghir, F. Behar-Cohen, R. Gurny, Cyclosporine A delivery to the eye: a pharmaceutical challenge, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56 (2003) 307–318.
- [7] S. Kashani, A.A. Mearza, Uses and safety profile of ciclosporin in ophthalmology, *Expert Opin. Drug Saf.* 7 (2008) 79–89.
- [8] S.M. Stepkowski, Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs, *Expert Rev. Mol. Med.* 2 (2000) 1–23.
- [9] S. Matsuda, S. Koyasu, Mechanisms of action of cyclosporine, *Immunopharmacology* 47 (2000) 119–125.
- [10] N. Andre, B. Roquelaure, J. Conrath, Molecular effects of cyclosporine and oncogenesis: a new model, *Med. Hypotheses* 63 (2004) 647–652.
- [11] A. Yoshida, T. Fujihara, K. Nakata, Cyclosporin A increases tear fluid secretion via release of sensory neurotransmitters and muscarinic pathway in mice, *Exp. Eye Res.* 68 (1999) 541–546.
- [12] H. Tshida, K. Nakayasu, A. Kanai, Effect of cyclosporin A eyedrops on tear secretion in rabbit, *Jpn. J. Ophthalmol.* 42 (1998) 168–173.
- [13] A.G. Palestine, R.B. Nussenblatt, C.C. Chan, Side effects of systemic cyclosporine in patients not undergoing transplantation, *Am. J. Med.* 77 (1984) 654–656.
- [14] E. Clarke, *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, second ed., Pharmaceutical Press, London, 1986.
- [15] A.R. Hamel, F. Hubler, A. Carrupt, R.M. Wenger, M. Mutter, Cyclosporin A prodrugs: design, synthesis and biophysical properties, *J. Pept. Res.* 63 (2004) 147–154.
- [16] F. Lallemand, O. Felt-Baeyens, S. Rudaz, A.R. Hamel, F. Hubler, R. Wenger, M. Mutter, K. Besseghir, R. Gurny, Conversion of cyclosporine A prodrugs in human tears vs. rabbits tears, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59 (2005) 51–56.
- [17] F. Lallemand, P. Furrer, O. Felt-Baeyens, M. Gex-Fabry, J.M. Dumont, K. Besseghir, R. Gurny, A novel water-soluble cyclosporine A prodrug: ocular tolerance and in vivo kinetics, *Int. J. Pharm.* 295 (2005) 7–14.
- [18] F. Lallemand, P. Perottet, O. Felt-Baeyens, W. Kloeti, F. Philippoz, J. Marfurt, K. Besseghir, R. Gurny, A water-soluble prodrug of cyclosporine A for ocular application: a stability study, *Eur. J. Pharm. Sci.* 26 (2005) 124–129.
- [19] F. Lallemand, E. Varesio, O. Felt-Baeyens, L. Bossy, G. Hopfgartner, R. Gurny, Biological conversion of a water-soluble prodrug of cyclosporine A, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67 (2007) 555–561.
- [20] P. Furrer, B. Plazonnet, J.M. Mayer, R. Gurny, Application of in vivo confocal microscopy to the objective evaluation of ocular irritation induced by surfactants, *Int. J. Pharm.* 207 (2000) 89–98.
- [21] L. Shargel, S. Wu-Pong, A.B.C. Yu, *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*, fifth ed., Appleton & Lange Reviews/McGraw-Hill, Medical Pub. Division, New York, 2005.
- [22] P. Furrer, R. Gurny, Recent advances in confocal microscopy for studying drug delivery to the eye: concepts and pharmaceutical applications, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 74 (2010) 33–40.
- [23] P. Kälin, Contribution à la validation d'un test de tolérance oculaire sur la souris, in: University of Lausanne, Lausanne, 1994.
- [24] G. Singh, R.L. Lindstrom, D.J. Doughman, Cyclosporin A on human corneal endothelium, *Cornea* 3 (1984) 272–277.
- [25] L. Gan, Y. Gan, C. Zhu, X. Zhang, J. Zhu, Novel microemulsion in situ electrolyte-triggered gelling system for ophthalmic delivery of lipophilic cyclosporine A: in vitro and in vivo results, *Int. J. Pharm.* 365 (2009) 143–149.
- [26] D.D. Tang-Liu, A. Acheampong, Ocular pharmacokinetics and safety of cyclosporin, a novel topical treatment for dry eye, *Clin. Pharmacokinet.* 44 (2005) 247–261.
- [27] D. Stevenson, J. Tauber, B.L. Reis, Efficacy and safety of cyclosporin A ophthalmic emulsion in the treatment of moderate-to-severe dry eye disease: a dose-ranging, randomized trial. The cyclosporin A phase 2 study group, *Ophthalmology* 107 (2000) 967–974.
- [28] P. Furrer, J.M. Mayer, B. Plazonnet, R. Gurny, Ocular tolerance of absorption enhancers in ophthalmic preparations, *AAPS PharmSci* 4 (2002) E2.
- [29] C.M. Hutak, R.B. Jacaruso, Evaluation of primary ocular irritation: alternative to the Draize test, in: I.K. Reddy (Ed.), *Ocular Therapeutics and Drug Delivery: A Multidisciplinary Approach*, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pennsylvania, USA, 1996, pp. 489–525.
- [30] L. Novakova, H. Vlckova, A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation, *Anal. Chim. Acta* 656 (2009) 8–35.
- [31] D. Guilleme, J. Schappler, S. Rudaz, J.L. Veuthey, Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry, *Trac-Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 15–27.
- [32] G. Dumortier, J.C. Chaumeil, Lachrymal determinations: methods and updates on biopharmaceutical and clinical applications, *Ophthalmic Res.* 36 (2004) 183–194.
- [33] Y. Ohashi, M. Dogru, K. Tsubota, Laboratory findings in tear fluid analysis, *Clin. Chim. Acta* 369 (2006) 17–28.
- [34] S. Barabino, M.R. Dana, Animal models of dry eye: a critical assessment of opportunities and limitations, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45 (2004) 1641–1646.
- [35] N. Worakul, J.R. Robinson, Ocular pharmacokinetics/pharmacodynamics, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 44 (1997) 71–83.
- [36] D. BenEzra, G. Maftzir, Ocular penetration of cyclosporine A in the rat eye, *Arch. Ophthalmol.* 108 (1990) 584–587.
- [37] R.L. Kaswan, Intraocular penetration of topically applied cyclosporine, *Transplant. Proc.* 20 (1988) 650–655.
- [38] C. Di Tommaso, F. Valamenes, F. Miller, P. Furrer, M. Rodriguez-Aller, F. Behar-Cohen, R. Gurny, M. Moller, A novel cyclosporin A aqueous formulation for dry eye treatment: in vitro and in vivo evaluation, submitted for publication.
- [39] A. Urtti, Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 1131–1135.
- [40] D. BenEzra, G. Maftzir, C. de Courten, P. Timonen, Ocular penetration of cyclosporin A. III: The human eye, *Br. J. Ophthalmol.* 74 (1990) 350–352.
- [41] A.A. Acheampong, M. Shackleton, D.D. Tang-Liu, S. Ding, M.E. Stern, R. Decker, Distribution of cyclosporin A in ocular tissues after topical administration to albino rabbits and beagle dogs, *Curr. Eye Res.* 18 (1999) 91–103.
- [42] A. Poon, M. Constantinou, E. Lamoureux, H.R. Taylor, Topical cyclosporin A in the treatment of acute graft rejection: a randomized controlled trial, *Clin. Exp. Ophthalmol.* 36 (2008) 415–421.
- [43] E. Mannermaa, K.S. Vellonen, A. Urtti, Drug transport in corneal epithelium and blood-retina barrier: emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 1136–1163.
- [44] D. BenEzra, G. Maftzir, Ocular penetration of cyclosporin A. The rabbit eye, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31 (1990) 1362–1366.
- [45] J. Theng, L. Zhou, D. Tan, K.W. La, Distribution of cyclosporin A in the cornea after topical or oral administration, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 18 (2002) 83–88.
- [46] M. Wiederholt, D. Kossendrup, W. Schulz, F. Hoffmann, Pharmacokinetic of topical cyclosporin A in the rabbit eye, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 27 (1986) 519–524.
- [47] M. Kuwano, H. Ibuki, N. Morikawa, A. Ota, Y. Kawashima, Cyclosporine A formulation affects its ocular distribution in rabbits, *Pharm. Res.* 19 (2002) 108–111.
- [48] K. Sall, O.D. Stevenson, T.K. Mundorf, B.L. Reis, Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease, CsA phase 3 study group, *Ophthalmology* 107 (2000) 631–639.
- [49] R.A. Laibovitz, S. Solch, K. Andriano, M. O'Connell, M.H. Silverman, Pilot trial of cyclosporine 1% ophthalmic ointment in the treatment of keratoconjunctivitis sicca, *Cornea* 12 (1993) 315–323.
- [50] A.G. Secchi, M.S. Tognon, A. Leonardi, Topical use of cyclosporine in the treatment of vernal keratoconjunctivitis, *Am. J. Ophthalmol.* 110 (1990) 641–645.
- [51] M.W. Belin, C.S. Bouchard, S. Frantz, J. Chmielinska, Topical cyclosporine in high-risk corneal transplants, *Ophthalmology* 96 (1989) 1144–1150.

On the use of an appropriate TUNEL assay to identify apoptotic cells

Cecile Lebon, Gloria Villalpando Rodriguez, Ikram Elzaoui, Imene Jaadane, Francine Behar-Cohen and Alicia Torriglia.

Centre de Recherches des Cordeliers, Inserm U 872, Université Pierre et Marie Curie, Université Paris Descartes. 15, rue de l'école de Médecine. 75006 Paris. France

Corresponding author: Alicia Torriglia:

Tel : 33 1 44 27 81 73

Fax : 33 1 44 27 81 83

e-mail : alicia.torriglia@inserm.fr

The TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling) assay [1] that reveals DNA breaks, is the most widely used method to identify apoptotic cells, in a tissue or cell culture, and therefore, it is commonly used to evaluate drug toxicity.

DNA degradation is one of apoptosis hallmarks. This process is executed by endogenous endonucleases and occurs in several steps. First, it is degraded into high molecular weight fragments (50 to 300 kb), then into oligonucleosome-sized fragments (multiple of 180 bp). Many endonucleases have been shown to be implicated in the DNA cleavage during apoptosis [2]. They can be classified by their activity in 3 groups: $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependent and Mg^{2+} -dependent endonucleases generating DNA fragments with 3'-OH/5'-P ends, and cation independent DNases producing breaks with 3'-P ends [3].

The TUNEL technique is based on the detection of 3'-OH termini that are labelled with dUTP by the terminal deoxynucleotidyltransferase. This method is very sensitive in labelling breaks induced by caspase activated DNase (CAD) or other apoptotic endonucleases generating 3'-OH ends. However, it is completely useless when the activated enzyme generates other ends. This is the case for L-DNase II [4-5], which, like most acid endonucleases, generates 3'-P ends [6]. In this case, even with an extensive degradation of DNA, the labelling remains negative since the terminal transferase is unable to bind a nucleotide to 3'-P ends.

In order to transform 3'-P into 3'-OH ends, we introduced a dephosphorylation step prior to the TUNEL labelling. This dephosphorylation can be induced by any phosphatase. We usually use calf intestine alkaline phosphatase (CIAP) accordingly to the manufacturer instructions. All phosphatases we have tested so far gave similar results. Figure 1 shows several examples of TUNEL negative cells turned into "TUNEL positive" after dephosphorylation. On panel A, each set of pictures represents BHK cells stained with the TUNEL technique with or without previous dephosphorylation. Control cells show no labelling, as expected, while cells treated with an inhibitor of the Na^+H^+ exchanger, hexamethylenamiloride (HMA) (an agent that induces L-DNase II dependant cell death) are positive only after dephosphorylation. As positive controls, same cells digested with DNase I, that produces 3'-OH ends, or DNase II that produces 3'-P ends are included. This type of results is also obtained in other situations. In panel B, slices from SCA7 mice retina show the presence of TUNEL positive cells only after dephosphorylation. The same holds true on panel C in which a flat mount of a rat retina has been treated with hydrocortisone and endothelial cells death has been investigated. In this case, we used a triple labelling: anti Von Willebrand factor for vessels (blue), anti LEI/L-DNase II antibody for activation of this pathway (red) and

TUNEL labelling (green), after or prior dephosphorylation. What we described in these examples is commonly seen in this neural tissue in which caspases are tightly controlled and where cell death frequently goes through caspases-independent pathways. These results are extremely important for toxicological purposes. It is very usual to evaluate toxicity of a compound by assessing the number of TUNEL positive cells. If caspases are activated, this technique is appropriated. However, if alternative pathways are activated, a wrong conclusion of no toxicity may be set up. This is the case of Triamcinolone treatment on macular edema where it has been shown that there is no caspase activation and the TUNEL labelling is negative [7]. Nevertheless, dephosphorylation step prior to TUNEL staining allowed showing dying endothelial cells through LEI/L-DNaseII pathway.

Bibliography

- [1] Y. Gavrieli, Y. Sherman, S.A. Ben-Sasson, Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, *J Cell Biol*, 119 (1992) 493-501.
- [2] K. Samejima, W.C. Earnshaw, Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6 (2005) 677-688.
- [3] M.F. Counis, A. Torriglia, DNases and apoptosis, *Biochem Cell Biol*, 78 (2000) 405-414.
- [4] A. Torriglia, P. Perani, J.Y. Brossas, E. Chaudun, J. Treton, Y. Courtois, M.F. Counis, L-DNase II, a molecule that links proteases and endonucleases in apoptosis, derives from the ubiquitous serpin leukocyte elastase inhibitor, *Mol Cell Biol*, 18 (1998) 3612-3619.
- [5] L. Padron-Barthe, C. Lepretre, E. Martin, M.F. Counis, A. Torriglia, Conformational modification of serpins transforms leukocyte elastase inhibitor into an endonuclease involved in apoptosis, *Mol Cell Biol*, 27 (2007) 4028-4036.
- [6] A.I. Scovassi, A. Torriglia, Activation of DNA-degrading enzymes during apoptosis, *Eur J Histochem*, 47 (2003) 185-194.
- [7] F. Valamanesh, A. Torriglia, M. Savoldelli, C. Gandolphe, J.C. Jeanny, D. BenEzra, F. Behar-Cohen, Glucocorticoids induce retinal toxicity through mechanisms mainly associated with paraptosis, *Mol Vis*, 13 (2007) 1746-1757.

Caption to figure:

Figure 1: TUNEL technique used to reveal apoptotic cells in different situations.

Panel A: Baby Hamster Kidney cells (BHK) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 4mM glutamine, 200 U/ml penicillin and 0.2 mg/ml streptomycin and 5 mg/ml fungizone (all from Life Technology), at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. They were seeded at a density of 20000 cells/cm², maintained in culture for 2 days and then treated for 18h with 40 µM HMA. HeLa cells (S3 clone) were grown in DMEM with GlutaMAX™ I supplemented with 10% fetal calf serum, 4,5g/L (25mM) D-Glucose, 0,11g/L (1mM) Sodium Pyruvate, 200 U/ml penicillin and 0.2 mg/ml streptomycin (all from Life Technology), at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. They were seeded at a density of 60000 cells/cm², maintained in culture for 2 days and then treated for 24h with 350µg/ml ciprofloxacin.

Left pictures show a DAPI nuclear staining, right pictures the TUNEL assay. For each conditions of TUNEL assay, the upper picture represents a classical TUNEL assay, following the manufacturer's protocol (Roche). In the lower picture (+Ph), the TUNEL staining has been preceded by an incubation with 20 units of calf intestine alkaline phosphatase (CIAP) (Invitrogen) during 30 min at 37 °C in the buffer provided by the manufacturer. C represents control cells in which both classical and modified TUNEL assays are negative. T represents treated cells.. In both DI and DII, cells have been incubated before the TUNEL staining with either Deoxyribonuclease I (Sigma) (DI) or Deoxyribonuclease II (Worthington) (DII). In DI, cells were incubated with 25 units of Deoxyribonuclease I (Sigma) for 30 min at room temperature in 50mM Tris-HCl, 50mM MgCl₂, 50mM CaCl₂ buffer (pH 7,4). In DII, cells were incubated with 25 units of Deoxyribonuclease II (Worthington) for 30 min at room temperature in 120mM Tris-HCl, 120mM EDTA buffer (pH 5,5).

Panel B: Eyes from wild type and SCA7 mice (kindely provided by Dr. Yvon Trottier) were mounted in Tissue Tek O.C.T. and frozen with liquid nitrogen immediately after enucleation. Then, 10µm frozen sections were cut on a Leica CM3050S freezing microtome. Sections were incubated in 4% formaldehyde in PBS for 15 min and in 0.3% Triton X-100/PBS for 15 min. TUNEL reaction were performed following manufacturer's protocol and preceded by incubation with CIAP as described before. Shown pictures are close-up of the photoreceptors nuclei layer.

Panel C: After enucleation, Lewis rat retinas were isolated, cut by 4 orthogonal incisions, transferred onto a Cyclopore 0.2 µm polycarbonate membrane (Whatman) and flat-mounted with the vitreal side up. The support membranes were placed in 6-well tissue culture plates containing 2 ml DMEM supplemented with 10% steroid-free FCS, 1% penicillin-streptomycin and 0.1% Amphotericin-B. Explants were treated with 0.5 mg/ml Hydrocortisone in media supplemented with 2% DFCS for 24h. After Hydrocortisone treatment, retinas were immediately washed and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min. They were then permeabilized with PBS containing 1% Triton X-100, and incubated with chicken anti-LEI and rabbit anti-von Willebrand (1:100) overnight at 4°C. After washing 5 times with PBS, retinas were incubated with the secondary antibody (Alexa Fluor® 405-conjugated goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor® 568-conjugated goat anti-chicken IgG) for 1h. On the left panel (-Ph), TUNEL staining has been performed alone while on the right panel (+Ph), it has been preceded by a dephosphorylation step as described before. Retinas were flat

mounted using Fluor mount. Images were taken using a confocal laser-scanning microscope Zeiss LSM 710.

