

## L'Année ophtalmologique

# Quoi de neuf en inflammation ? Les cytokines seront les vedettes



**D. OSSWALD, A. SAUER**

Service d'ophtalmologie, CHU, STRASBOURG.

Les cytokines sont des protéines de bas poids moléculaires, dont la fonction principale est la communication intercellulaire. Il en existe donc de très nombreuses sortes dans tout l'organisme. Celles qui nous intéressent particulièrement en ophtalmologie, sont les cytokines impliquées dans l'élaboration de la réponse immunitaire [1].

En effet, les cytokines sont essentielles pour amorcer le processus immunitaire en stimulant l'immunité cellulaire pour certaines (TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ...) et l'immunité humorale pour d'autres (TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-13...) qui vont intervenir dans le processus de défense de l'hôte face à une agression. Par ailleurs, certaines cytokines (IL-1, IL-6, IL-12, IFN- $\alpha$ ) entraînent elles-mêmes le relargage d'autres cytokines, contribuant ainsi à l'alimentation du stress oxydatif, à l'établissement d'un cercle d'auto-entretien et donc à l'installation d'une inflammation chronique.

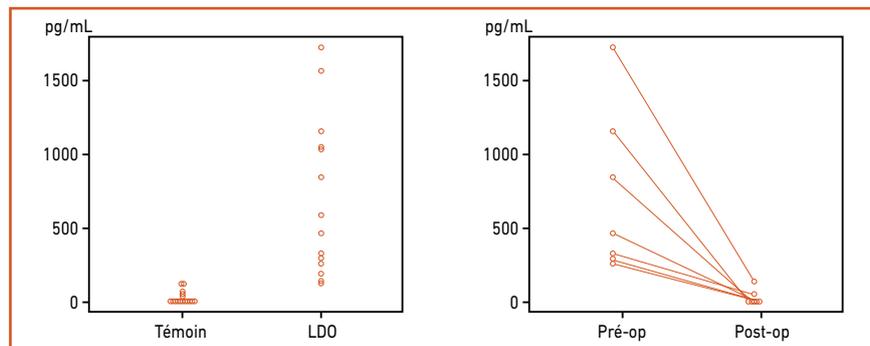
Jusqu'à présent, la technique de référence en laboratoire pour le dosage des

cytokines était la méthode ELISA standard, dotée d'une excellente sensibilité et spécificité mais qui avait pour désavantage majeur, de ne pouvoir analyser qu'un seul type de protéine à la fois par échantillon. Or en ophtalmologie, nous savons bien que les prélèvements sont généralement de très faible quantité (200  $\mu$ L d'humour aqueuse maximum) et/ou en nombre limité (seulement deux vitrectomies possibles pour un même patient). Désormais, l'utilisation des nouvelles technologies de Multiplex Arrays facilite l'analyse simultanée de plusieurs protéines (jusqu'à 27 types différents) avec un meilleur débit, un volume d'échantillon réduit et un moindre coût. La révolution de l'analyse cytokinique est en marche [2,3].

### La révolution de l'analyse cytokinique dans le film lacrymal

Récemment, diverses équipes se sont penchées sur l'analyse cytokinique dans le film lacrymal dans plusieurs domaines de pathologies.

Par exemple, une étude japonaise a analysé les niveaux de cytokines dans les échantillons de larmes de patients présentant une obstruction congénitale des voies lacrymales. [4] Les larmes ont été recueillies séparément du côté sain et du côté pathologique chez 15 enfants avant et après la chirurgie de désobstruction. Grâce au Multiplex Arrays, les niveaux d'IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, INF- $\gamma$  et IL-17A ont pu être mesurés dans chaque échantillon. Seule la concentration d'IL-6 a été significativement retrouvée plus élevée du côté obstrué que du côté sain ( $p < 0,001$ ) et une décroissance également significative de la concentration d'IL-6 a été mise en évidence dans les larmes après la chirurgie. Les auteurs concluent qu'IL-6 pourrait être utilisée comme un biomarqueur de l'obstruction congénitale du canal lacrymal en pédiatrie. Il ne faut cependant pas perdre de vue dans cette situation, qu'IL-6 est une cytokine aspécifique dont la sécrétion est augmentée lors des états inflammatoires chroniques notamment, donc lors des infections à répétition comme il peut y en avoir dans les obstructions des voies lacrymales (**fig. 1**).



**Fig. 1 :** À gauche : Comparaison des niveaux d'IL-6 dans les larmes en cas d'obstruction du canal lacrymal versus témoin. À droite : Comparaison des niveaux d'IL-6 en préopératoire et postopératoire dans les larmes en cas d'obstruction du canal lacrymal.

# L'Année ophtalmologique

D'autres équipes ont analysé les cytokines présentes dans les larmes de patients atteints de kératoconjonctivites vernaes (KCV) et de patients atteints de conjonctivites giganto-papillaires (CGP) en les comparant à des sujets sains. Il apparaît, là encore, qu'IL-6 est significativement plus élevée dans les KCV et les CGP que chez les sujets sains. Par ailleurs, le TIMP-2 est augmenté spécifiquement dans les CGP, tandis que l'éotaxine2 est augmentée spécifiquement dans les KCV et pourrait ainsi expliquer l'activation éosinophile constatée dans la physiopathologie de la maladie [5].

Plus récemment encore, l'étude des cytokines dans les larmes des patients atteints de kératocône a permis de mettre en évidence une augmentation d'IL-6 et de MMP-9 ainsi que d'IL-1 et d'INF- $\gamma$  et de manière plus surprenante, une diminution d'IL-10 qui, elle, est une cytokine plutôt anti-inflammatoire. Ces résultats apportent une preuve supplémentaire que le stress oxydatif et l'inflammation chronique ont un rôle dans la genèse et le développement du kératocône et que des thérapeutiques spécifiques pourraient être mise en place dans ce sens. [6].

## La révolution de l'analyse cytokinique dans la DMLA

Il est désormais acquis qu'une part inflammatoire intervient dans la constitution des lésions de la DMLA. Une infiltration macrophagique sous rétinienne est retrouvée dès les phases précoces de la néo-angiogenèse, ainsi qu'une prolifération de cellules de l'inflammation chronique localisées au niveau de la membrane de Bruch. L'analyse de l'humeur aqueuse de patients atteints de formes de DMLA exsudatives avec néovaisseaux récurrentes et/ou persistantes a permis de mettre en lumière des cytokines pro-inflammatoires et pro-angiogéniques impliquées dans les mécanismes physiopathologiques de la maladie. Ainsi, une étude autrichienne, prospective sur 12 mois, a analysé l'humeur aqueuse de 40 yeux atteints de DMLA exsudative, traités soit par des IVT de ranibizumab seules, soit par une combinaison ranibizumab + dexaméthasone. Les échantillons d'humeur aqueuse ont été prélevés à l'initiation du traitement puis lors de chaque nouvelle injection (réalisée selon un schéma "as needed").

Les résultats montrent que les patients atteints de DMLA exsudative ont une concentration de MCP-1, MIG et lipocaline-2 plus élevée ( $p = 0,01$ ) que les sujets sains et une concentration de TNF $\alpha$ , IL-12 et SPARC plus basse ( $p = 0,03$ ) que les sujets sains. La sécrétion de VEGF est en revanche similaire avant le traitement chez les sujets atteints et les sujets sains. Les patients traités par ranibizumab seul ne montrent pas de variation significative du taux de leurs cytokines inflammatoires et pro-angiogéniques, tandis que ceux bénéficiant de la combinaison ranibizumab + dexaméthasone, voient leur niveau de MIG, VEGF, TGF- $\beta$  et PDGF diminuer sous l'effet du traitement (fig. 2).

Il apparaît que chez les patients ayant été traités par la combinaison d'IVT, une corrélation entre les niveaux d'IL-6 et de PDGF et l'épaisseur centrale de la rétine soit établie; avec l'amincissement rétinien s'opère une décroissance de ces cytokines ( $p < 0,05$ ).

Il n'y avait pas de différence statistiquement significative quant à la fonction visuelle entre les deux groupes de traitement.

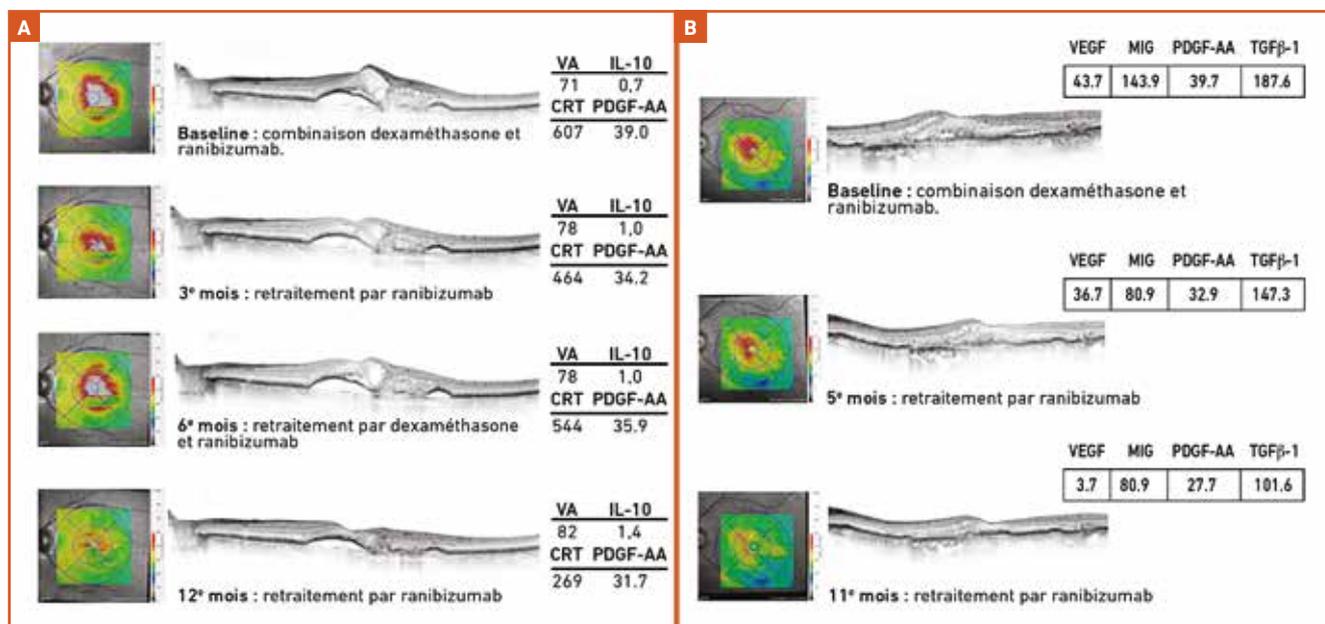


Fig. 2 A et B: Images OCT au moment du traitement corrélées aux niveaux de cytokines.

La DMLA est une maladie multifactorielle et il devient de plus en plus claire que le traitement par anti-VEGF seuls pourrait ne pas être suffisant. Les cytokines sont impliquées dans la physiopathologie de la DMLA et sont effectivement corrélées à l'activité de la maladie [7]. D'autres études sont nécessaires afin d'identifier le *pattern* cytokinique précis de la DMLA et ainsi obtenir de nouvelles cibles thérapeutiques.

### La révolution de l'analyse cytokinique dans la cataracte congénitale

La chirurgie de la cataracte, l'opération de routine la plus fréquente en ophtalmologie est, elle aussi, impactée par l'étude du profil cytokinique au décours de la prise en charge. L'inflammation, et surtout l'inflammation chronique, est présente à tous les stades de la prise en charge de certaines cataractes, en effet elle peut tout d'abord jouer un rôle prépondérant dans la genèse et la densification de l'opacification cristallinienne (comme complication des uvéites ou du diabète). Par la suite, l'acte opératoire en lui-même est pourvoyeur d'inflammation réactionnelle à l'ouverture du globe et lors de la phacoémulsification. C'est d'ailleurs ce phénomène qui semble lié au développement de plusieurs complications postopératoires telles que le TASSyndrom, l'œdème maculaire d'Irvine Gasse et également de la cataracte secondaire.

Une des situations dans laquelle l'analyse cytokinique semble d'autant plus intéressante est la cataracte congénitale. On estime qu'environ 200 000 enfants sont aveugles en raison d'une cataracte ou suite à des complications de sa prise en charge à travers le monde. En comparaison aux adultes, les enfants font des réactions inflammatoires postopératoires très marquées (pouvant aller jusqu'à l'uvéite fibrineuse) qui conditionnent grandement le pronostic fonctionnel de l'acte chirurgical. Pour cette raison, le traitement comprend généra-

lement une injection sous conjonctivale de bétaméthasone peropératoire et des corticoïdes systémiques et topiques en postopératoire. Le deuxième élément grévant la récupération visuelle est la survenue d'une opacification secondaire de la capsule postérieure. La prise en charge de cette dernière est plus délicate que chez l'adulte selon l'âge de l'enfant, c'est pourquoi un capsulorhexis postérieur couplé à une vitrectomie antérieure est souvent pratiqué en peropératoire. 100 % des enfants qui ne bénéficient pas d'un capsulorhexis postérieur feront une cataracte secondaire et tout de même 40 à 60 % de ceux qui en ont bénéficié. D'où l'intérêt de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de ces opacifications à distance.

Une des études sur le sujet a suivi une cohorte de 18 patients atteints de cataracte congénitale et a comparé les dosages cytokiniques effectués chez eux, à ceux retrouvés dans un groupe contrôle atteint de cataracte sénile [8]. Grâce au

Multiplex Arrays, 19 cytokines ont pu être recherchées dans chaque échantillon d'humeur aqueuse prélevée en préopératoire. Tous les patients ont bénéficié d'une capsulotomie postérieure et d'une vitrectomie antérieure peropératoire, 83 % des patients de la série ont malgré tout développé une cataracte secondaire dans les 2 ans de suivi.

Le groupe de cataractes congénitales a clairement montré une élévation significative des marqueurs de l'inflammation IL-1β, IL-15, INF-γ, IL-12, IL-6, IL-5, IL-9, MIP-1α, MCP-1 et IP-10 par rapport au groupe contrôle. D'autre part, l'opacification secondaire de la capsule postérieure est significativement corrélée au taux d'IL-1β, de TNFα et d'IL-6 préopératoire (**tableau 1**).

Un nouvel axe physiopathologique se dessine, selon lequel l'implant intraoculaire n'est plus l'unique responsable dans la genèse de l'opacification capsulaire postérieure.

Cytokines	Senile cataract	Congenital cataract	p
IL-1β	9.7 [2.0]	21.6 [6.0]	***
IL-1Rα	23.8 [2.9]	25.8 [5.9]	ns
IL-2	2.3 [1.4]	2.4 [1.0]	ns
IL-15	14.1 [3.8]	57.5 [26.8]	***
IFN-γ	5.9 [6.1]	23.1 [6.4]	***
TNF-α	16.2 [3.7]	27.6 [10.8]	**
IL-12(p70)	15.9 [20.1]	50.6 [14.6]	***
IL-6	67.0 [54.2]	655.1 [356.5]	***
IL-7	10.1 [4.1]	27.2 [7.9]	**
IL-4	17.9 [4.2]	27.4 [7.9]	*
IL-5	3.9 [2.3]	12.6 [2.7]	***
IL-13	14.7 [7.1]	35.7 [18.7]	**
IL-17	19.4 [4.6]	23.0 [6.7]	ns
IL-10	28.0 [27.8]	82.4 [8.8]	**
IL-9	13.3 [10.3]	88.9 [16.4]	***
IL-8	88.9 [119.1]	82.8 [18.8]	ns
MIP-1α	4.8 [6.7]	42.3 [8.1]	***
MIP-1β	109.9 [122.6]	165.0 [53.0]	ns
MCP-1	190.3 [69.0]	522.6 [86.5]	***
IP-10	27.1 [37.7]	482.2 [237.6]	***
G-CSF	8.7 [20.3]	73.0 [42.6]	**
GM-CSF	227.5 [283.4]	491.2 [68.7]	*
RANTES	10.1 [12.4]	13.0 [4.5]	ns
Eotaxin	1.7 [0.2]	1.7 [0.2]	ns
FGF	37.7 [41.9]	101.9 [45.0]	*
VEGF	463.3 [322.6]	387.1 [71.7]	ns
PDGF-bb	5.6 [7.1]	32.2 [11.2]	**

## I L'Année ophtalmologique

### ■ Conclusion

Le rôle des cytokines dans la pathologie inflammatoire ophtalmologique est désormais établi. De nombreux domaines sont concernés, que ce soit celui des uvéites ou des pathologies inflammatoires de surface oculaire mais aussi dans celui de la sécheresse oculaire, du kératocône et des anomalies du film lacrymal. La recherche s'étend, entre autres, aux rétinopathies diabétiques, à la DMLA et à la survenue des cataractes primaires et secondaires. Cependant, le type précis du profil cytokinique, sa séquence d'intervention et leurs cascades d'activations restent à déterminer encore plus précisément.

En décortiquant ces mécanismes, de nouveaux arsenaux thérapeutiques plus spécifiques et sans doute plus efficaces car plus ciblés, pourront être développés et appliqués. Un réel espoir pour l'amélioration du pronostic fonctionnel visuel

et donc de la qualité de vie des patients atteints de ces pathologies diverses pour lesquels nous sommes encore actuellement trop souvent dans l'impasse thérapeutique.

### BIBLIOGRAPHIE

1. *British Journal of Ophthalmology*, 1994;78:885-887.
2. C. DUPONT, KEHUI WANG, PATHIK D *et al.* Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: Determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants. *J Reprod Immunol*, 2005;66:175-191.
3. SEAN X. LENG, JANET E. McELHANEY *et al.* Kuchel. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2008;63:879-884.
4. MATSUMURA N, GOTO S, UCHIO E *et al.* Cytokine profiles of tear fluid from patients with pediatric lacrimal duct obstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017;58:252-256.
5. Antibody Array-Generated Cytokine Profiles of Tears of Patients with Vernal Keratoconjunctivitis or Giant Papillary Conjunctivitis Article. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 2006;50:195-204.
6. SUZANNE HAGAN S, EILIDH MARTIN E, ENRIQUEZ-DE-SALAMANCA A. Tear fluid biomarkers in ocular and systemic disease: potential use for predictive, preventive and personalised medicine. *EPMA J*, 2016;7:15.
7. REZAR-DREINDL S, SACU S, EIBENBERGER K *et al.* The Intraocular Cytokine Profile and Therapeutic Response in Persistent Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016;57:4144-4150.
8. SAUER A, BOURCIER T, GAUCHER D *et al.* Intraocular cytokines imbalance in congenital cataract and its impact on posterior capsule opacification. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2016;254:1013-1018.

Les auteurs ont déclaré ne pas avoir de conflits d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.