Pourquoi l'épithélium pigmentaire semble être notre prochain front de progrès ?

RÉSUMÉ : Les progrès récents de l'imagerie, de l'intelligence artificielle et la possibilité de produire des cellules de l'épithélium pigmentaire (EP) à partir de cellules souches permettent une meilleure compréhension du fonctionnement de l'EP et son implication dans les pathologies rétiniennes. Les inhibiteurs du complément entraînent une légère diminution de la progression de l'atrophie et une moindre altération des photorécepteurs dans la DMLA atrophique. Les transferts de gène peuvent traiter certaines formes de dystrophies rétiniennes dues à des mutations du RPE65. Ils ouvrent la possibilité de transférer un gène codant pour un fragment d'anticorps anti-VEGF chez les patients ayant une DMLA exsudative.

➞ **S RAZAVI**
Centre Ophtalmologique Saint-Exupéry, TOURS.

Lorsqu'on étudie l'œil, on ne peut s'empêcher d'être fasciné par sa beauté, sa complexité et sa physiologie. L'épithélium pigmentaire rétinien est l'une des cellules les plus passionnantes de l'organisme. Le Club Francophone des Spécialistes de la Rétine (CFSR) a consacré trois heures à l'épithélium pigmentaire lors de sa dernière réunion au cours du congrès de la société française d'ophtalmologie au mois de mai 2023. Les chercheurs et les cliniciens ont eu l'occasion de présenter les avancées en matière d'imagerie, de physiologie, de pathologie et de traitement.

L'épithélium pigmentaire rétinien joue un rôle central dans la vision pour des raisons physiques (en absorbant la lumière), physiologiques (notamment le cycle visuel), métaboliques (apport des nutriments et évacuation des déchets), immunologiques (privilège immun de l'œil) et pour la production de facteurs de croissance (PEDF et VEGF) (***fig. 1***).

Au cours des dernières années, les progrès de l'imagerie, de l'intelligence artificielle et de l'électrophysiologie ont permis une meilleure compréhension de la physiologie et des pathologies de l'EP.

Imagerie

Une nouvelle technique d'imagerie de la rétine est le *Transscleral Optical Phase Imaging* (TOPI). Cette méthode est

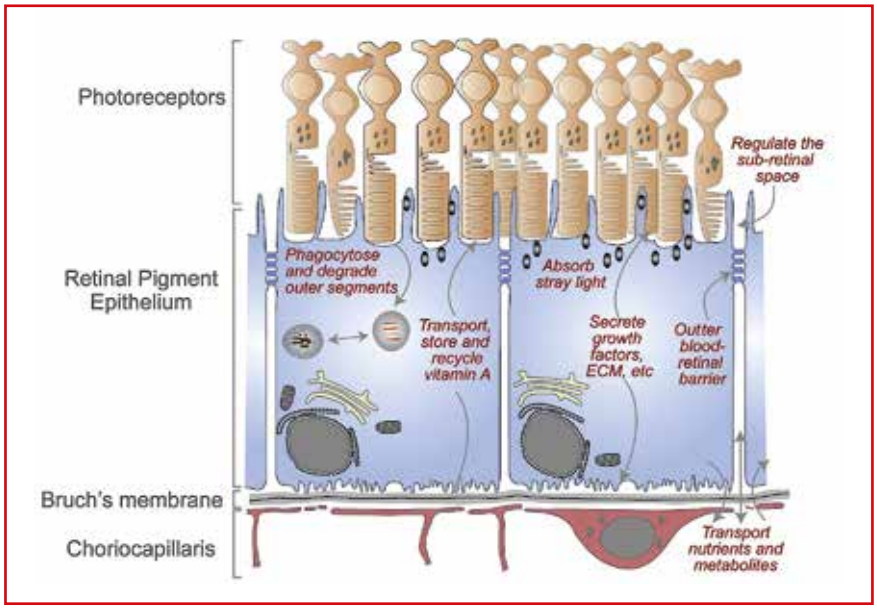

Fig. 1 : L'épithélium pigmentaire rétinien joue un rôle central dans la vision pour des raisons physiques (en absorbant la lumière), physiologiques (notamment le cycle visuel), métaboliques (apport des nutriments et évacuation des déchets), immunologiques (privilège immun de l'œil) et pour la production de facteurs de croissance (PEDF et VEGF). D'après Lakkaraju A, Umapathy A, Tan LX, *et al.* The cell biology of the retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res*, 2020;Feb 24:100846.

basée sur une illumination transsclérale de la rétine et permet de visualiser les cellules de l'EP de manière précise [1]. La lumière transmise à travers la sclère permet une illumination oblique de la rétine postérieure, qui est ensuite imagée à l'aide d'un système de caméra plein champ trans-pupillaire à optique adaptative (***fig. 2A et 2B***). La diminution de la densité cellulaire et le changement de la morphologie cellulaire pourraient potentiellement être détectables au stade précoce de la DMLA et de certaines dystrophies rétiniennes. La technologie TOPI pourrait également être utilisée pour détecter les effets iatrogéniques de certains médicaments au niveau de l'EP et pour évaluer l'efficacité des nouveaux traitements de la DMLA et des dystrophies. De nouveaux critères morphologiques quantitatifs pourraient ainsi émerger.

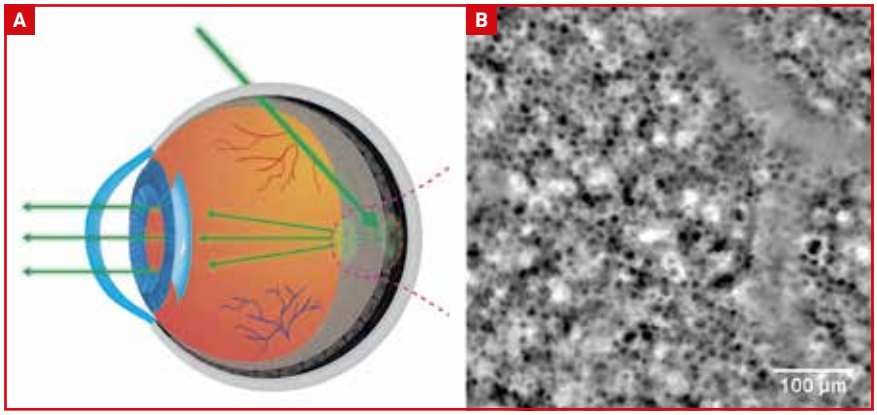

Fig. 2A : *Transscleral Optical Phase Imaging* (TOPI). Cette méthode est basée sur une illumination transsclérale de la rétine et permet de visualiser les cellules de l'EP de manière précise. La lumière transmise à travers la sclère permet une illumination oblique de la rétine postérieure, qui est ensuite imagée à l'aide d'un système de caméra plein champ trans-pupillaire à optique adaptative [1]. **B :** Cellules de l'EP humain. La partie floue correspond au vaisseau rétinien.

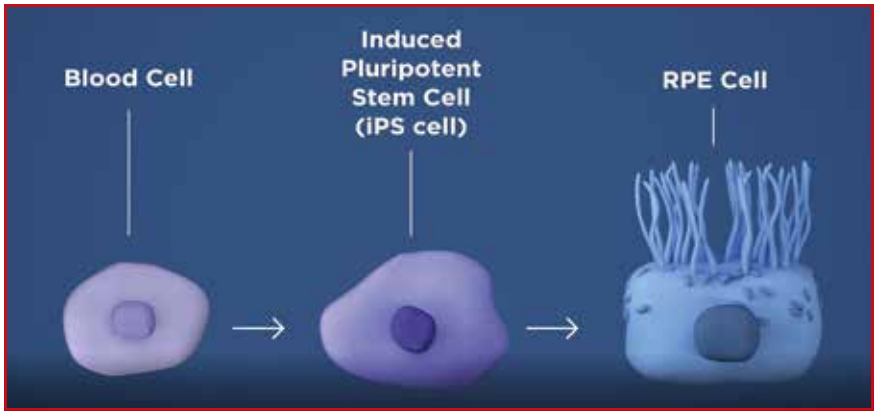

Fig. 3 : Cellules épithéliales pigmentaires rétiniennes humaines (RPE) dérivées d'une cellule pluripotente induite. D'après NIH Image Gallery from Bethesda, Maryland, USA — How iPSC Works.

Fig. 4 : Patient ayant une DMLA atrophique avant greffe de cellules de l'EP et un an après. Les cellules de l'EP recouvrent une grande partie de la zone d'atrophie [3].

Cellules souches

De nouvelles avancées ont eu lieu dans la compréhension de plusieurs pathologies grâce à l'étude des cellules de l'EP produites à partir de cellules souches (***fig. 3***). Les recherches comparant les cellules d'EP de culture témoins à des cellules de patients ayant une choroïdérémie ont montré la probabilité d'un dysfonctionnement de canaux calciques au cours de cette maladie et la possibilité de nouvelles pistes thérapeutiques [2]. La faculté de générer des cellules d'EP portant une mutation génétique particulière permet de valider l'implication de la mutation dans l'apparition d'un dysfonctionnement en étudiant l'anatomie et la physiologie des cellules de l'EP portant la mutation d'intérêt.

La fabrication de cellules de l'EP à partir de cellules souches embryonnaires pourrait peut-être permettre la réalisation de greffes chez des patients ayant une dystrophie rétinienne héréditaire ou une DMLA atrophique [3] (***fig. 4***).

Les cellules de l'EP cultivées en laboratoire permettent également de mettre au point des modèles de prolifération vitréorétinienne très utiles pour rechercher des molécules susceptibles d'inhiber cette prolifération chez les patients à risque. Une étude portant sur l'inhibition de la PVR par l'acide 13-cis-rétinoïque a été présentée par Arnaud Lefevre

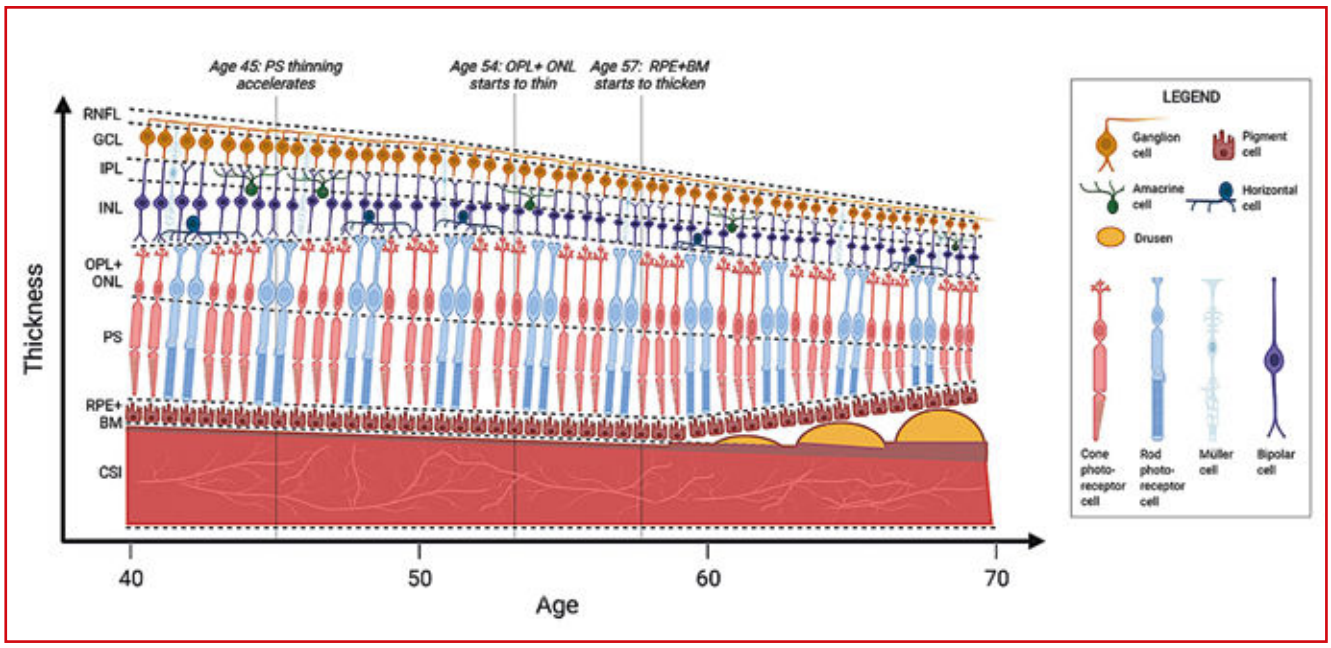

Fig. 5 : Étude de l'épaisseur des différentes couches de la rétine chez 44 000 patients de 40 à 70 ans. L'amincissement des photorécepteurs précède de plusieurs décennies l'épaississement des cellules de l'EP et de la membrane de Bruch. L'amincissement des photorécepteurs et l'épaississement du complexe EP et de la membrane de Bruch sont associés épidémiologiquement à l'incidence de la DMLA [5].

et l'équipe du Pr Isabelle Meunier de Montpellier et a montré une inhibition de la prolifération.

MLA et DMLA

Il a été longtemps admis que les maculopathies et dégénérescences liées à l'âge étaient dues à l'accumulation de déchets au sein de l'EP en raison d'un stress oxydatif ou inflammatoire [4]. Les dysfonctions de l'EP pourraient entraîner secondairement des pathologies des photorécepteurs. L'avènement de l'intelligence artificielle, des OCT de meilleure résolution et des grandes bases de données ont permis l'analyse d'un très grand nombre de patients et semblent montrer que les atteintes des photorécepteurs précèdent de plusieurs décennies l'atteinte des cellules de l'EP identifiables en OCT.

Une étude récente a analysé l'OCT et le génome de 44 000 patients entre 40 et 70 ans avec un suivi médian de dix ans [5]. Un amincissement des photorécepteurs (PR) a été observé tout au long de la vie des individus, tandis que l'épaississement du complexe de l'épithélium pigmentaire et de la membrane de Bruch a commencé après l'âge de 57 ans (***fig. 5***). Chaque écart-type de déviation standard de l'amincissement des PR et de l'épaississement du complexe RPE-BM était associé à une augmentation de l'incidence de DMLA.

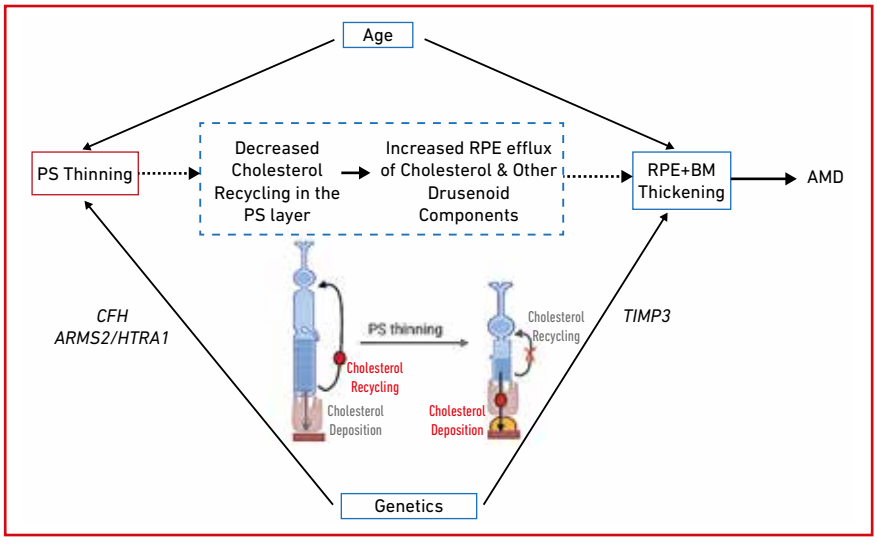

Fig. 6 : Plusieurs loci de risque génétique de DMLA héréditaire sont associés à un amincissement des photorécepteurs (loci CFH et ARMS2/HTRA1) et à un épaississement du complexe EP et de la membrane de Bruch (locus TIMP3). Une hypothèse liant l'amincissement des photorécepteurs à l'épaississement du complexe EP et de la membrane de Bruch est qu'une diminution du recyclage du cholestérol dans le segment externe des photorécepteurs altérés entraîne une augmentation des dépôts de cholestérol dans la membrane de Bruch qui, avec le temps, se transforment en dépôts de drusen.

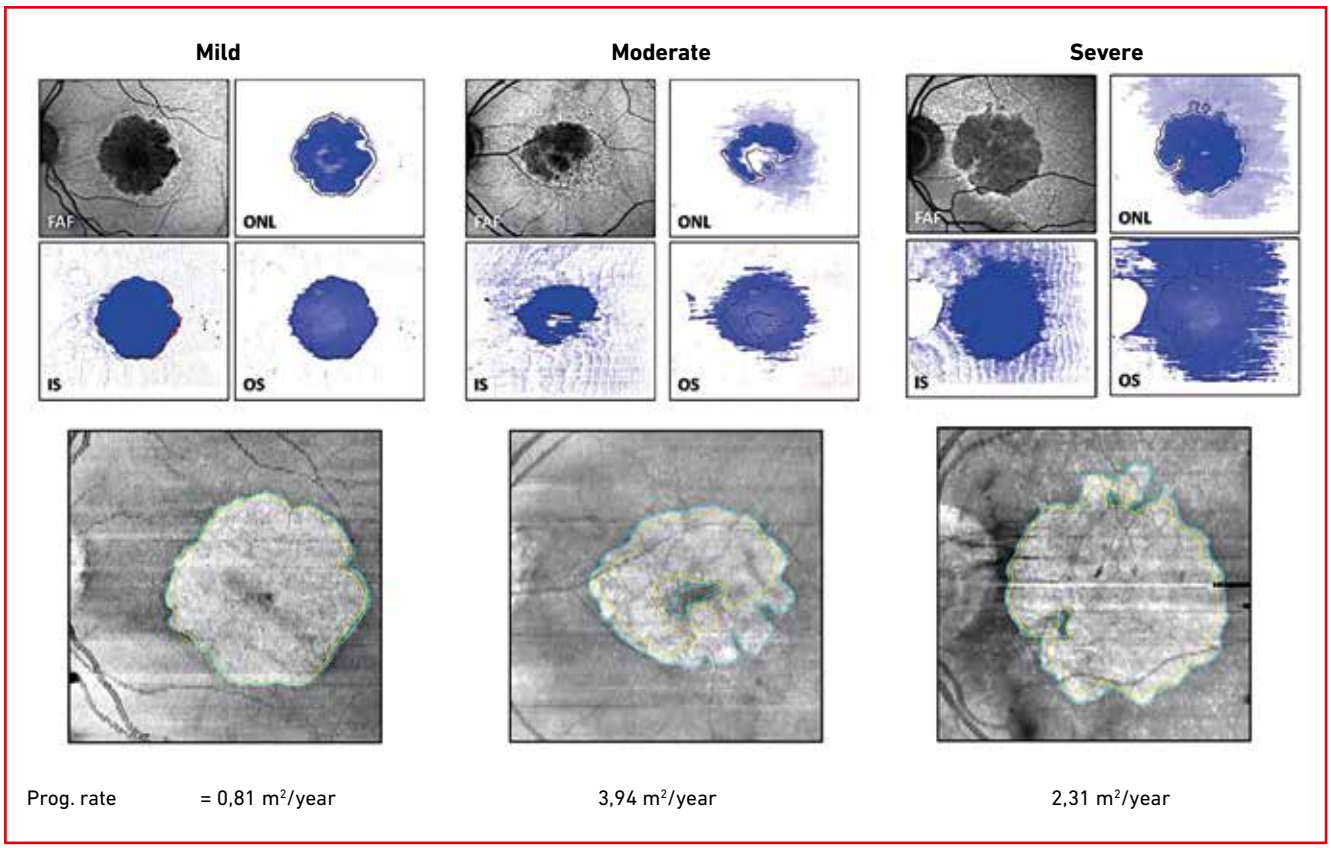

Fig. 7 : Les patients ayant une DMLA atrophique et une altération des photorécepteurs importants en dehors de la zone d'atrophie ont un taux de progression d'atrophie plus élevé que ceux qui ont une altération moindre [6].

Génétiquement, certains variants de risque de DMLA sont associés à un amincissement des photorécepteurs. L'altération des photorécepteurs est un biomarqueur à un stade précoce des futurs drusen et de la DMLA.

Certaines études ont émis l'hypothèse selon laquelle les photorécepteurs sont essentiels au recyclage du cholestérol, et qu'un recyclage altéré (par des mécanismes tels que la dégénérescence ou l'altération des photorécepteurs) pourrait augmenter la charge de cholestérol dans les cellules de l'EP et ainsi favoriser le développement des drusen [7] (***fig. 6***). S'il est incontestable que l'amincissement des PR précède de plusieurs décennies les altérations de l'EP et la formation des drusen, il est difficile d'être certain que l'altération de l'EP est secondaire à l'altération des PR.

Ces résultats laissent supposer le lien entre des variantes génétiques de la DMLA et l'amincissement des photorécepteurs et suggèrent l'utilisation clinique de l'amincissement de la couche des PR comme biomarqueur à un stade précoce du risque de développement futur de la DMLA [5] (***fig. 7***).

Traitement génique des pathologies rétiniennes

L'œil présente des caractéristiques qui en font un organe cible idéal pour la thérapie génique :
– il est facile à atteindre par voie intravitréenne, sous rétinienne ou suprachoroïdienne (***fig. 8***) ;
– la barrière hémato-rétinienne séparant le milieu rétinien de la circulation sanguine, les vecteurs administrés restent piégés sans causer d'effets systémiques indésirables ;
– l'œil bénéficie d'un privilège immun, ce qui est très avantageux pour l'application de vecteurs viraux ;

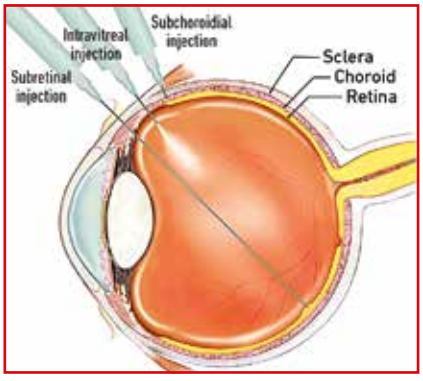

Fig. 8 : L'œil présente des caractéristiques qui en font un organe cible idéal pour la thérapie génique. Il est facile à atteindre par voie intravitréenne, sous rétinienne ou suprachoroïdienne. D'après Rafieetary S et Huddleston S, *Retina specialist*, March 20, 2023.

– les cellules rétiniennes sont post-mitotiques. Tout transfert de gène vers ces cellules est en principe permanent ;
– un **virus adéno-associé AAV** est un petit virus à ADN, à simple brin non pathogène, existant à la fois chez l'homme et les primates. Les AAV sont des vecteurs de choix, car ils permettent une expression forte et stable du transgène dans la rétine tout en étant faiblement immunogènes, et ils n'induisent pas d'effet cytopathique ou cancérigène. Les AAV sont des vecteurs non intégratifs, à savoir que le gène thérapeutique reste dans la cellule de l'hôte sans s'insérer dans son génome et qu'il s'exprime pendant la durée de vie de la cellule et disparaît avec la mort de celle-ci.

Plusieurs dystrophies rétiniennes, notamment l'amaurose congénitale de Leber, la choroïdérémie ou certaines formes de la maladie de Usher et de rétinite pigmentaire (*myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase*, MERTK) sont dues à des mutations génétiques entraînant des dysfonctionnements de l'EP et donc des PR.

1. Mutation RPE65

L'injection de voretigene neparvovec (Luxturna) dans l'espace sous-rétinien conduit à la transduction des cellules de l'EP par un ADNc codant la protéine RPE65 humaine normale (thérapie génique d'augmentation), offrant le potentiel de restaurer le cycle visuel [8]. Les données de l'étude pivot de phase III ont révélé une amélioration fonctionnelle statistiquement significative de la vision chez les patients en termes de seuil d'adaptation à l'obscurité (*Full field Stimulus Threshold*, FST). Les résultats ont également montré une meilleure capacité à suivre un parcours de mobilité à différents niveaux d'éclairage environnemental. Les patients traités présentent une amélioration de leur qualité de vie grâce à une amélioration de leurs capacités de déplacement, en particulier dans la pénombre, et à une légère amélioration de l'acuité visuelle dans certains sous-groupes, notamment les enfants.

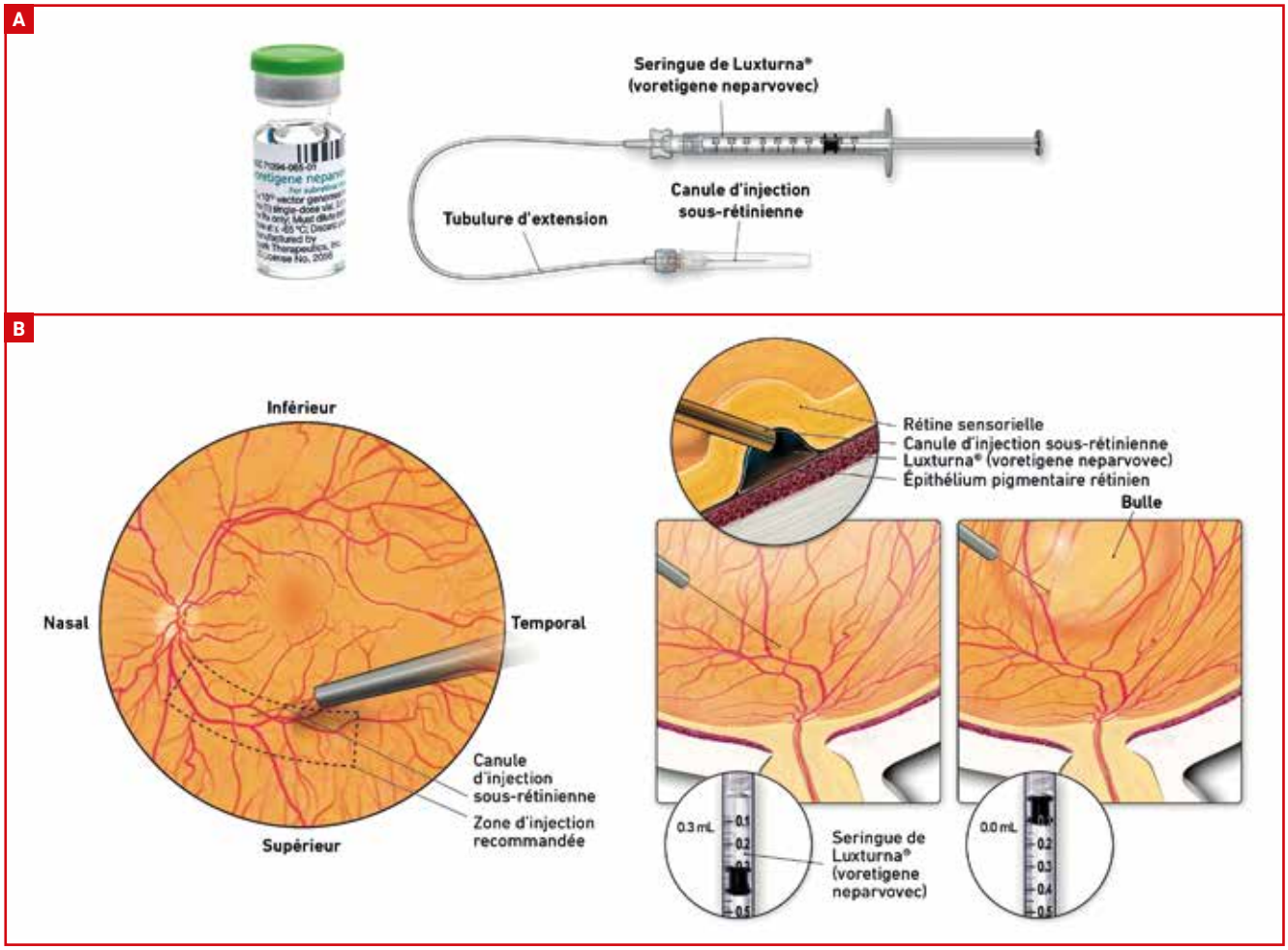

Fig. 9A et 9B : L'injection de voretigene neparvovec (Luxturna) dans l'espace sous-rétinien conduit à la transduction des cellules de l'EP par un ADNc codant la protéine RPE65 humaine normale (thérapie génique d'augmentation), offrant le potentiel de restaurer le cycle visuel.

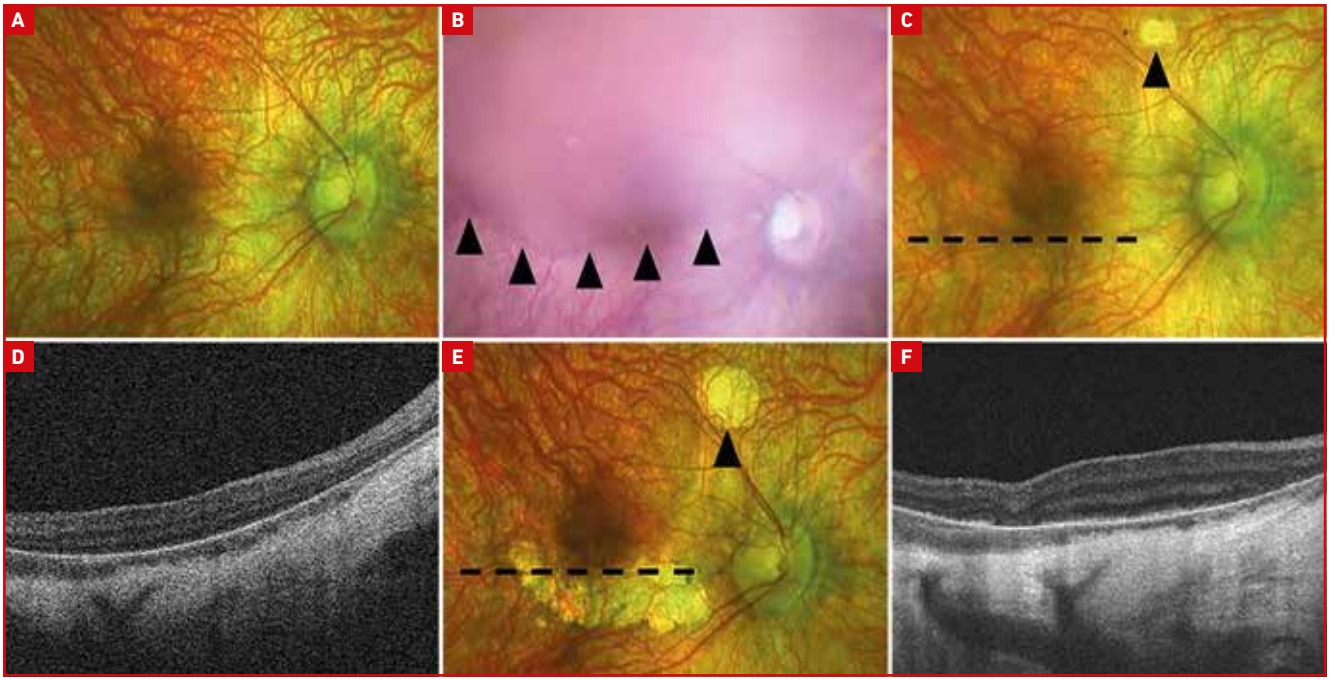

Fig. 10 : Apparition d'une atrophie de l'EP et des PR chez un patient après injection sous-rétinienne de voretigene neparvovec. **A :** Aspect préopératoire. **B :** Bulle de décollement du site d'injection. **C :** Aspect un mois après. On note la zone d'atrophie au niveau du site d'injection. **E :** Un an après l'injection, il y a une atrophie en dehors de la bulle d'injection [9].

Fig. 11 : Patient de 87 ans ayant une DMLA exsudative et qui a eu treize injections d'anti-VEGF avant l'injection sous-rétinienne de RGX-314. Après l'injection, il n'y a pas eu de récidive au cours de l'année suivant le transfert de gène.

POINTS **FORTS**

- Le *Transscleral Optical Phase Imaging* (TOPI) est une méthode basée sur une illumination transsclérale de la rétine et permet de visualiser les cellules de l'EP de manière précise.
- La possibilité de produire des cellules de l'EP à partir des cellules souches permet une meilleure compréhension du fonctionnement de l'épithélium pigmentaire et de son implication dans les pathologies rétiniennes.
- L'amincissement de la couche des photorécepteurs est observé tout au long de la vie tandis que l'épaississement du complexe de l'épithélium pigmentaire et de la membrane de Bruch survient plusieurs décennies plus tard. Il est possible que l'altération des photorécepteurs soit à l'origine de l'atteinte secondaire des cellules de l'EP et de la formation de drusen.
- Les transferts de gène permettent le traitement de certaines formes de dystrophies rétiniennes dues à des mutations du gène du RPE65 et ouvrent la possibilité de transférer un gène codant pour un fragment d'anticorps anti-VEGF chez les patients ayant une DMLA exsudative.
- Les inhibiteurs du complément permettent une légère diminution de la progression de l'atrophie dans la DMLA atrophique.

Le Luxturna est indiqué depuis novembre 2018 pour le traitement des adultes et des enfants présentant une perte visuelle due à une dystrophie rétinienne héréditaire, résultant de mutations bi-alléliques confirmées du gène RPE65, et possédant suffisamment de cellules rétiniennes viables. Cette mutation représente 0,3 à 1 % des cas de rétinopathie pigmentaire. En tant que thérapie génique liée à l'injection d'un produit comportant de l'adénovirus, le Luxturna ne peut être délivré que dans les hôpitaux ayant obtenu l'autorisation des autorités sanitaires (CHNO des Quinze-Vingts, Hôpitaux universitaires de Strasbourg, Hôpital Necker, CHU de Nantes).

L'équipe du Pr Isabelle Audo a été la première à traiter les patients en France. Plusieurs études ont montré l'apparition d'atrophie de l'EP et des photorécepteurs chez les patients ayant été traités par voretigene neparvovec [9] (***fig. 9***). L'atrophie survient aussi bien au sein de la bulle de traitement qu'en dehors.

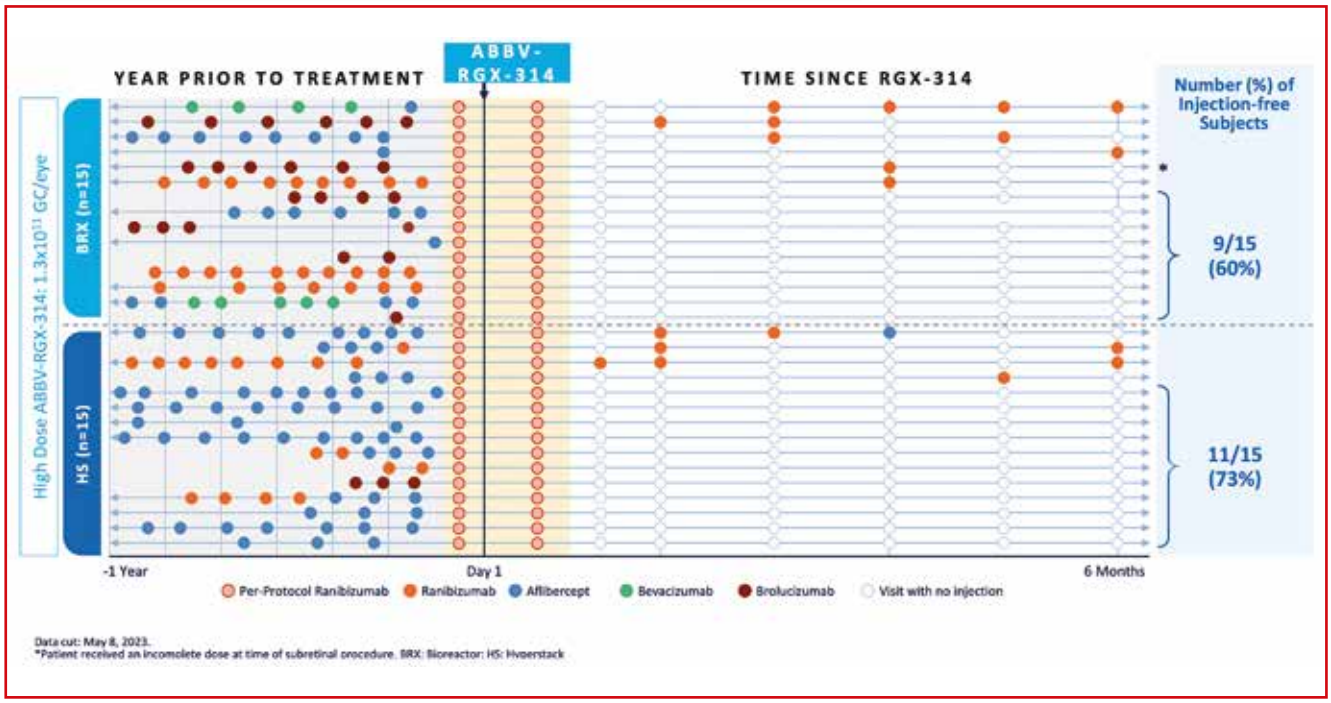

Fig. 12 : Les résultats de la phase I montrent une très nette diminution de la nécessité de retraiter les patients ayant une DMLA exsudative après l'injection du RGX-314 en sous-rétinien.

Les explications possibles du développement de l'atrophie incluent des réactions immunitaires contre le génome du vecteur ou contre la capside. L'atrophie n'a pas entraîné, à court terme, de baisse de l'acuité visuelle ou encore de dégradation du seuil d'adaptation à l'obscurité (FST). Cependant, un suivi à long terme est nécessaire afin de rechercher les conséquences de l'atrophie.

Le succès de cette thérapie génique a inspiré d'autres recherches ciblant d'autres mutations génétiques. De nombreux essais cliniques sont actuellement en cours dans la choroïdérémie et d'autres

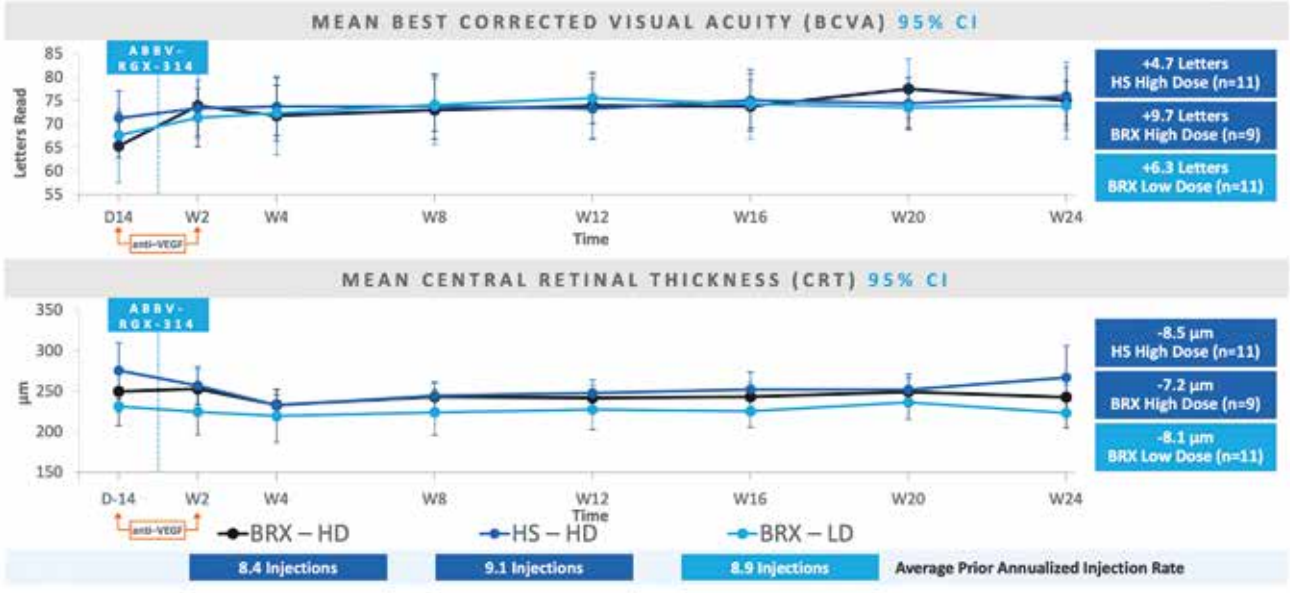

Fig. 13 : Modification de l'acuité visuelle et de l'épaisseur de la rétine après injection sous-rétienne de RGX-314 chez des patients ayant une DMLA exsudative.

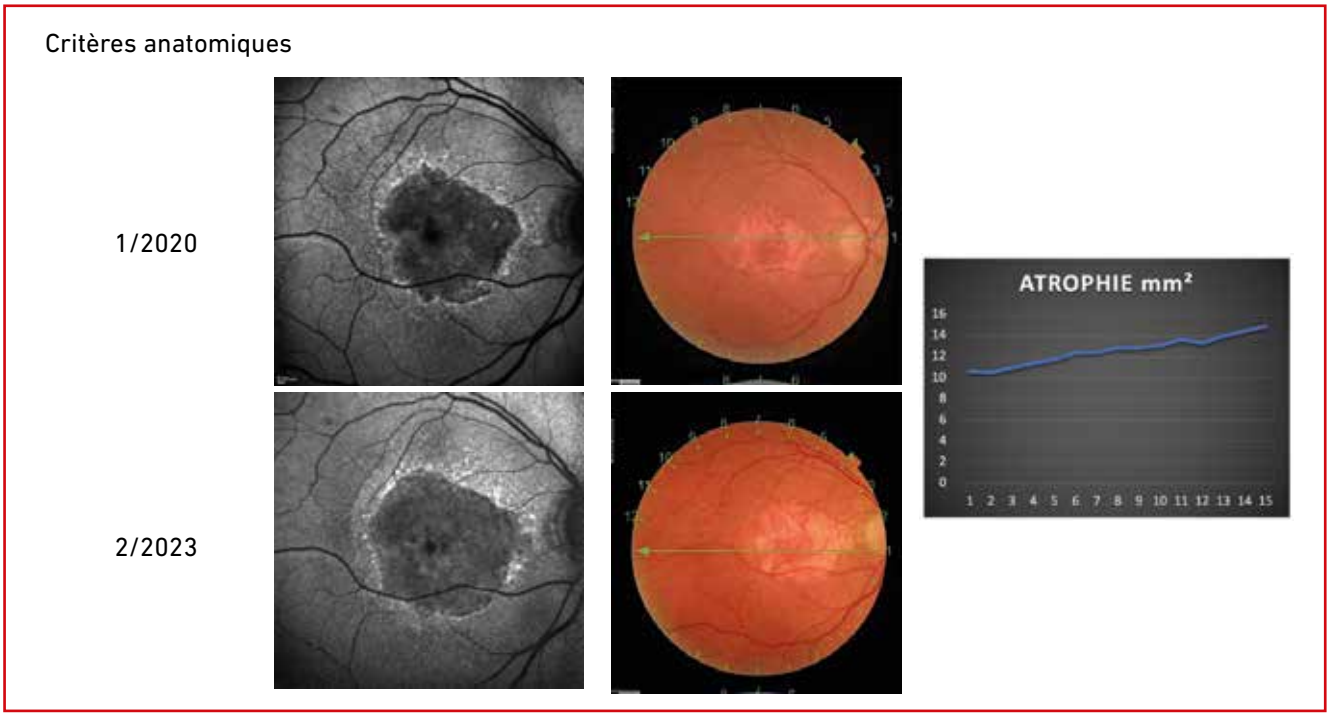

Fig. 14 : DMLA atrophique. Il y a une augmentation de la zone d'atrophie au cours du temps.

rétinopathies pigmentaires. C'est pour cette raison que tout patient atteint d'une dystrophie rétinienne héréditaire doit avoir une consultation avec génotypage dans un centre de référence pour bénéficier d'un traitement ou se voir proposer une participation à un essai clinique.

2. DMLA exsudative

Plusieurs études sont en cours pour traiter la DMLA néovasculaire par un traitement génique. Le RGX-314 est constitué du vecteur AAV8, qui code un fragment d'anticorps conçu pour inhiber le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) [10]. Le vecteur est injecté par voie sous-rétinienne ou supra-choroïdienne. L'ADVM-022 est également un vecteur adénovirus qui code pour un fragment d'anticorps anti-VEGF, injecté par voie intravitréenne. Les résultats des études de phase I de ces deux traitements sont très séduisants et montrent un transfert durable du gène de l'anti-VEGF et une très nette diminution de la nécessité de faire des injections d'anti-VEGF par voie intravitréenne chez les patients (***fig. 10 et 11***). Il y a une augmentation de l'acuité visuelle et une diminution de l'épaisseur de la rétine chez certains patients (***fig. 12***). Plusieurs études de phase II sont en cours afin d'évaluer l'efficacité et la tolérance de ces nouveaux traitements, en particulier l'apparition de phénomène inflammatoire.

3. DMLA atrophique

Des études portent sur le traitement de la DMLA atrophique par transfert de gène du complément Factor I (Adverum Biotechnologies) ou par augmentation de la production de CD59 qui inhibe le complément (Janssen) (***fig. 13***).

Traitement de la DMLA atrophique par inhibiteur du complément

Deux traitements de la DMLA atrophique inhibant le complément viennent d'avoir l'autorisation de la FDA dans le traitement de la DMLA atrophique (***fig. 14***) :
– le Pegcetacoplan (Syfovre) inhibe le C3 [11]. Les injections sont tous les mois ou tous les deux mois. Les résultats à deux ans montrent une réduction de l'élargissement de la zone d'atrophie géographique de 20 % (***fig. 15***). Les résultats sont meilleurs lorsque l'atrophie est extra-fovéolaire avec une

Fig. 15 : Le Pegcetacoplan (Syfovre), inhibiteur du C3, et l'Avacincaptad Pegol (Izervay), inhibiteur du C5, viennent d'avoir l'autorisation de la FDA dans le traitement de la DMLA atrophique.

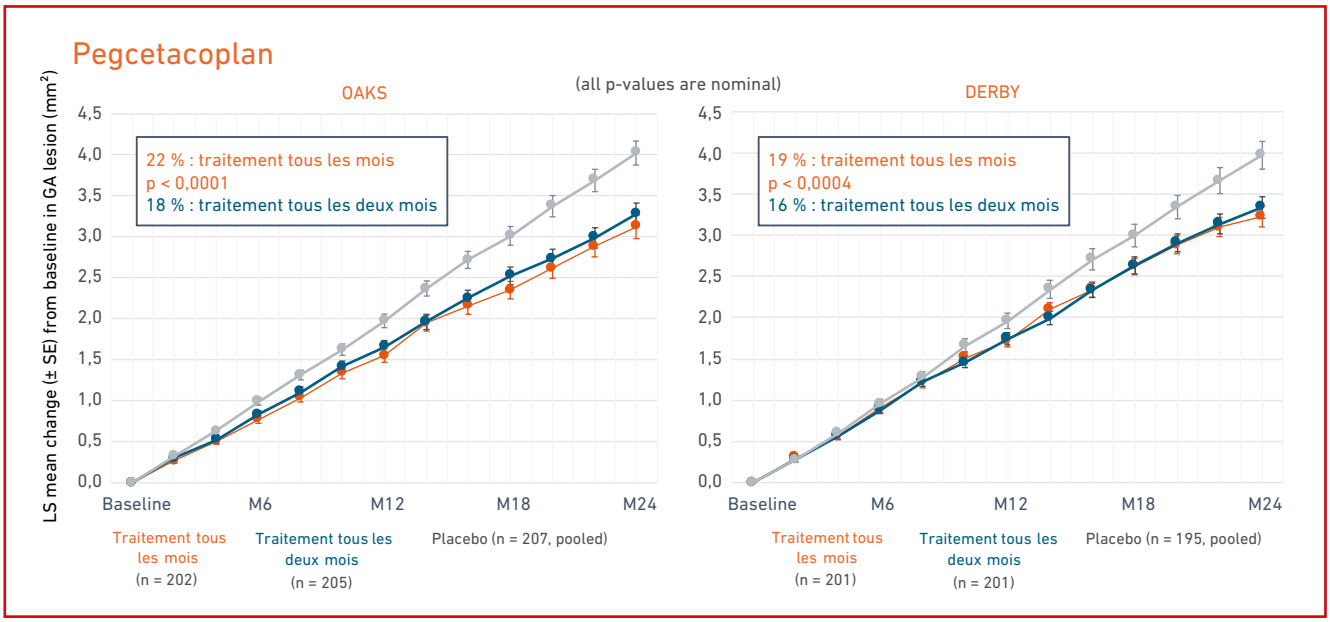

Fig. 16 : Le traitement par un inhibiteur du complément Pegcetacoplan (Syfovre) tous les mois ou tous les deux mois diminue la progression de la zone d'atrophie par rapport au placebo.

diminution de l'élargissement de 22 à 26 %. Il y a une diminution de la perte et de l'altération des photorécepteurs chez les patients traités [12] (***fig. 16***). Il n'y a pas de différence statistiquement significative en ce qui concerne l'acuité visuelle ou encore la vitesse de lecture entre le groupe traité et le groupe témoin (***fig. 17 et 18***). Il existe une augmentation de l'incidence des néovaisseaux choroïdiens de 7 à 12 % selon la fréquence des injections (*versus* 3 % dans le groupe placebo). Par ailleurs, la survenue de rares vascularites occlusives a été récemment rapportée aux États-Unis où le médicament est désormais commercialisé ;

– l'Avacincaptad Pegol (Izervay) inhibe le C5 [13]. Les résultats à un an retrouvent une diminution de la progression de l'atrophie de 14 % (étude Gather 2) à 27 % (étude Gather 1). On note la présence d'une complication néovasculaire chez 7 à 9 % des patients traités. Il n'y a pas de différence statistiquement significative en ce qui concerne la baisse de l'acuité visuelle entre le groupe traité et le groupe témoin.

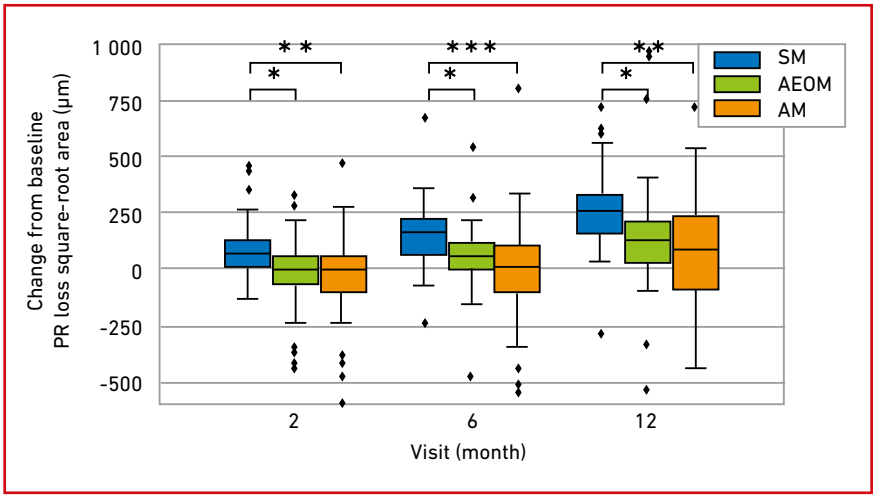

Fig. 17 : L'effet du traitement au Pegcetacoplan sur le maintien des photorécepteurs dans la DMLA atrophique par une analyse OCT basée sur l'intelligence artificielle. SM : placebo. AEOM : injection de Pegcetacoplan tous les deux mois. AM : injection de Pegcetacoplan tous les mois. Il y a une moins grande destruction des PR chez les patients traités que chez les patients du groupe placebo à 2, 6 et 12 mois [6].

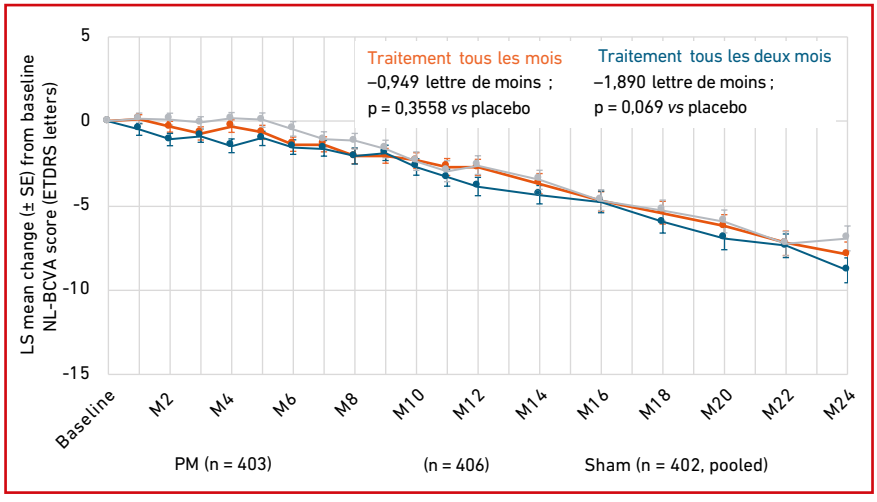

Fig. 18 : Il n'y a pas de différence de perte d'acuité visuelle chez les patients traités par Pegcetacoplan *versus* placebo.

Conclusion

Les inhibiteurs du complément et la possibilité de transfert de gène dans les dystrophies rétiniennes et la DMLA exsudative ouvrent de nouvelles possibilités de traitement chez des patients ayant des pathologies pour lesquelles nous étions jusque-là désarmés.

BIBLIOGRAPHIE

1. Laforest T, Künzi M, Kowalczuk L *et al.* Transscleral optical phase imaging of the human retina. *Nat. Photonics*, 2020;14,439-445.
2. Mamaeva D, Jazouli Z, DiFrancesco ML *et al.* Novel roles for voltage-gated T-type Ca2+ and ClC-2 channels in phagocytosis and angiogenic factor balance identified in human iPSC-derived RPE. *FASEB J.*, 2021;35:e21406.
3. Kashani AH, Lebkowski JS, Hinton DR *et al.* Survival of an HLA-mismatched, bioengineered RPE implant in dry age-related macular degeneration. *Stem Cell Reports*, 2022;17:448-458.
4. Bird A. Role of retinal pigment epithelium in age-related macular disease: a systematic review. *Br J Ophthalmol*, 2021;105:1469-1474.
5. Zekavat S, Sekimitsu S, Ye Y *et al.* Photoreceptor Layer Thinning Is an Early Biomarker for Age-Related Macular Degeneration: Epidemiologic and Genetic Evidence from UK Biobank OCT Data. *Ophthalmology*, 2022;129:694-707.
6. Pfau M. Progression of Photoreceptor Degeneration in Geographic Atrophy Secondary to Age-related Macular Degeneration. *JAMA Ophthalmol*, 2020;138:1026-1034.
7. Zekavat SM, Lu J, Maugeais C, Mazer NA. An in silico model of retinal cholesterol dynamics (RCD model): insights into the pathophysiology of dry AMD. *J Lipid Res*, 2017;58:1325-1337.
8. Russell S, Bennett J, Wellman JA. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised,

controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, 2017;390:849-860.

9. Gange W, Sisk R, Besirli C *et al.* Perifoveal Chorioretinal Atrophy after Subretinal Voretigene Neparvovec-rzyl for RPE65-Mediated Leber Congenital Amaurosis. *Ophthalmol Retina*, 2022;6:58-64.
10. Ding K, Shen J, Hafiz Z *et al.* AAV8-vectored suprachoroidal gene transfer produces widespread ocular transgene expression. *J Clin Invest*, 2019;129: 4901-4911.
11. Liao DS, Grossi FV, El Mehdi D *et al.* Complement C3 Inhibitor Pegcetacoplan for Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration: A Randomized Phase 2 Trial. *Ophthalmology*, 2020;127:186-195.
12. Riedl S, Vogl WD, Mai J *et al.* The Effect of Pegcetacoplan Treatment on Photoreceptor Maintenance in Geographic Atrophy Monitored by Artificial Intelligence-Based OCT Analysis. *Ophthalmol Retina*, 2022;6: 1009-1018.
13. Jaffe GJ, Westby K, Csaky KG *et al.* C5 Inhibitor Avacincaptad Pegol for Geographic Atrophy Due to Age-Related Macular Degeneration: A Randomized Pivotal Phase 2/3 Trial. *Ophthalmology*, 2021;128:576-586.

S RAZAVI
Centre Ophtalmologique
Saint-Exupéry, TOURS.

L'auteur a déclaré être consultant pour Novartis, Bayer, Roche, Apellis.