



HAL
open science

Rôle des chimiokines CXCL12 et CXCL1 dans la physiopathologie du trabéculum et de la surface oculaire au cours du glaucome

Alexandre Denoyer

► **To cite this version:**

Alexandre Denoyer. Rôle des chimiokines CXCL12 et CXCL1 dans la physiopathologie du trabéculum et de la surface oculaire au cours du glaucome. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. Français. NNT : 2011PA066079 . tel-00824694

HAL Id: tel-00824694

<https://theses.hal.science/tel-00824694v1>

Submitted on 22 May 2013

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.



THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Physiologie et physiopathologie (ED394)

Présentée par **M. Alexandre Henri DENOYER**

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

**ROLE DES CHIMIOKINES CXCL12 ET CX3CL1
DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DU TRABECULUM
ET DE LA SURFACE OCULAIRE AU COURS DU GLAUCOME**

Soutenue le :

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur José-Alain SAHEL, président du jury,
Monsieur le Docteur William ROSTENE, directeur de thèse,
Monsieur le Professeur Christophe BAUDOUIN, co-directeur de thèse,
Monsieur le Professeur Marc LABETOULLE, rapporteur,
Monsieur le Docteur Karl BALABANIAN, rapporteur,
Madame le Professeur Francine BEHAR-COHEN, examinatrice,
Monsieur le Professeur Bahram BODAGHI, examinateur,
Madame le Docteur Amanda PROUDFOOT, examinatrice.

Rôle des chimiokines CXCL12 et CX3CL1 dans la physiopathologie du trabéculum et de la surface oculaire au cours du glaucome.

Résumé: Le glaucome constitue la première cause de cécité irréversible dans le monde. Le glaucome primitif à angle ouvert (GPAO) est une neuropathie optique rétinienne dont le premier facteur de risque est l'hypertonie intraoculaire. Cette élévation pathologique de la pression intraoculaire (PIO) est liée à une dégénérescence du trabéculum dont les mécanismes demeurent inconnus. Ainsi, les traitements hypotonisants actuels ne soignent pas la trabéculopathie glaucomateuse initiale, ce qui pourrait expliquer l'inefficacité thérapeutique progressive rencontrée en pratique clinique. En outre, les collyres antiglaucomateux actuels contiennent fréquemment un conservateur, le chlorure de benzalkonium (BAC), qui est responsable d'une inflammation iatrogène de la surface oculaire chez les patients traités au long cours.

Les chimiokines sont des cytokines qui ont été initialement décrites du fait de leurs propriétés chimioattractantes envers les leucocytes *via* des récepteurs spécifiques couplés aux protéines G. Parallèlement à ses propriétés chimiotactiques, la chimiokine CXCL12 présente des fonctions extra-immunitaires, notamment un rôle dans la régulation de la viabilité cellulaire et de la composition de la matrice extracellulaire *via* CXCR4. Récemment, il a été démontré que la protéolyse de CXCL12 produisait une forme clivée, SDF-1(5-67), aux effets proapoptotiques par l'intermédiaire d'un autre récepteur : CXCR3. Dans cette thèse, nous avons mis en évidence une expression de CXCL12, CXCR3 et CXCR4 par les cellules trabéculaires dans les trabéculums humains glaucomateux et dans une lignée trabéculaire glaucomateuse. Nous démontrons l'existence d'une balance entre le système CXCL12/CXCR4 aux effets protecteurs et le système SDF-1(5-67)/CXCR3 qui induit une apoptose trabéculaire, sous le contrôle de cytokines et métalloprotéinases impliquées dans le GPAO. Nous rapportons de façon originale que l'utilisation *in vivo* d'un antagoniste non-peptidique spécifique de CXCR3 diminue la PIO en restaurant la fonction et la cellularité trabéculaires dans un modèle animal de glaucome, ouvrant ainsi de nouvelles voies thérapeutiques contre le GPAO.

En parallèle, nous avons étudié l'implication de la chimiokine CX3CL1 dans l'inflammation de la surface oculaire liée au BAC. La chimiokine CX3CL1 est caractérisée par sa capacité à attirer certaines populations lymphocytaires et monocytaires exprimant son récepteur CX3CR1. Dans cette étude, nous révélons que la conjonctive des patients glaucomateux exposés aux collyres contenant du BAC surexprime CX3CL1. *In vitro*, nous démontrons que les cellules épithéliales conjonctivales stimulées par le BAC attirent certaines populations leucocytaires en produisant CX3CL1. *In vivo*, nous rapportons que l'absence du récepteur CX3CR1 chez la souris KO diminue l'infiltration de la conjonctive par les macrophages en cas d'exposition au BAC, montrant ainsi que le système CX3CL1/CX3CR1 est impliqué dans le trafic des cellules immunitaires au sein de la surface oculaire.

Ces résultats révèlent ainsi que certains systèmes chimiokinergiques sont impliqués dans la physiopathologie du segment antérieur de l'œil dans le GPAO. Les chimiokines apparaissent comme un système inédit de régulation physiologique et pathologique de l'environnement trabéculaire et de la surface oculaire, constituant ainsi de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques.

Discipline: Physiologie et physiopathologie.

Mots clés: Apoptose, chimiokines, chlorure de benzalkonium, conjonctive, conservateurs, CX3CL1, CX3CR1, CXCL12, CXCR3, CXCR4, CXCR7, glaucome, hypertension intraoculaire, inflammation, récepteurs des chimiokines, trabéculum.

Adresse de l'auteur: Alexandre Denoyer, INSERM UMRS 968, CNRS UMR7210, Institut de la Vision, équipe 8, 17 rue Moreau, 75012 Paris.

Involvement of the chemokines CXCL12 and CX3CL1 in the pathophysiology of the trabecular meshwork and ocular surface in glaucoma

Abstract: Glaucoma is the first cause of irreversible blindness in the world. Primary open-angle glaucoma (POAG) mostly combines retinal neuropathy with abnormal elevation of the intraocular pressure, which is the first risk factor for the disease. Ocular hypertension is caused by a trabecular meshwork degeneration whose primary mechanisms are still unknown. Indeed, the current antiglaucoma treatment does not target the initial trabecular pathology so it is not curative. Moreover, antiglaucoma eye drops often contain a preservative, such as benzalkonium chloride (BAC), which has been demonstrated to cause ocular surface inflammation in glaucomatous patients treated over a long term period.

Chemokines, small proteins from the cytokine family, have been first described for their chemotactic properties for leukocytes through their interaction with G protein coupled receptors. Aside from its immune properties, the chemokine CXCL12 is involved in the regulation of cell viability and extracellular matrix remodelling through its receptor CXCR4. Recently, it has been reported that proteolytic cleavage of CXCL12 yields a proapoptotic form, SDF-1(5-67), acting *via* another chemokine receptor: CXCR3. In this thesis, CXCL12, CXCR3 and CXCR4 have been detected in trabecular cells in human glaucomatous trabecular tissue and immortalized cell line. We originally describe a balance between the protective system CXCL12/CXCR4 and SDF-1(5-67)/CXCR3 which induces trabecular apoptosis under the control of cytokines and matrix metalloproteinases known to be involved in POAG. We report the successful use *in vivo* of a non-peptide specific antagonist of CXCR3 in reducing ocular hypertension and restoring trabecular function in an animal model of glaucoma, opening up new therapeutic avenues in glaucoma.

We also studied the role of another chemokine, CX3CL1, in the ocular surface inflammation induced by BAC. CX3CL1 is characterized by powerful chemoattract properties on CX3CR1-bearing leukocytes. In this study, we report an overexpression of CX3CL1 in conjunctival epithelial cells in glaucomatous patients treated with a BAC-containing medication. *In vitro*, we demonstrate that BAC-stimulated conjunctival epithelial cells attract lymphocytic and monocytic subpopulations by producing CX3CL1. In an animal model of BAC-induced ocular toxicity, we report a decrease in macrophage infiltration to the conjunctiva in CX3CR1-deficient mice compared to wild-type animals, further confirming that CX3CL1/CX3CR1 is involved in immune cell trafficking in the ocular surface.

Our results originally show that chemokines are involved in the pathophysiology of the anterior segment in glaucoma. Chemokines appear as a new regulating system for the pathogenesis of trabecular degeneration in glaucoma as well as for ocular surface inflammation, and could constitute new specific therapeutic targets in such deleterious diseases.

Key words: Apoptosis, chemokines, conjunctiva, CX3CL1, CX3CR1, CXCL12, CXCR3, CXCR4, CXCR7, glaucoma, inflammation, ocular hypertension, preservative, chemokine receptors, trabecular meshwork.

Remerciements

A Monsieur le Docteur William Rostène, mon directeur de thèse. Quelle aventure la science ! Conquête intellectuelle, parce que tu m'as appris à remettre en cause mes certitudes de praticien, à progresser chaque jour dans la validation ou non d'hypothèses parfois audacieuses, et à valoriser nos découvertes. Expérience humaine, parce que tu m'as aidé à m'intégrer dans ce monde de la recherche, à encadrer les moins expérimentés, à gérer les tensions humaines inhérentes à tout microcosme. Exutoire de l'esprit, parce que la diversité de mes activités et des personnes que je rencontre est une richesse indispensable à mon équilibre, et parce que faire de la science s'est aussi repenser l'homme et son contexte.

A Monsieur le Professeur Christophe Baudouin, mon co-directeur de thèse, mon maître. Ces quelques phrases ne suffiront pas à témoigner combien je vous suis reconnaissant pour le soutien et la confiance que vous m'avez accordés. Travailler à vos côtés et entreprendre ensemble de nouveaux projets cliniques et scientifiques me permettent chaque jour de grandir personnellement et professionnellement. Je partage sans compromis votre conception du Service *stricto sensu* hospitalo-universitaire que vous défendez sans jamais faiblir. Votre façon d'être représente pour moi une source permanente d'enrichissement et d'enthousiasme. Veuillez trouver dans ces mots l'expression de mon admiration et de mon plus grand respect.

A Monsieur le Professeur José-Alain Sahel. Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Vous représentez à mon sens à la fois la singularité et la synthèse d'une carrière vouée aux sciences de l'Homme. Vous avez porté ce projet unique d'un institut d'excellence où chercheurs académiques, partenaires industriels et cliniciens se rencontrent et construisent autour de l'ophtalmologie et du patient. Votre culture, votre intelligence et votre intégrité sont à mes yeux exemplaires. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Marc Labetoulle. J'admire la rigueur et l'opiniâtreté avec laquelle tu mènes la recherche, la clinique et l'enseignement. Ton soutien et l'intérêt que tu portes à mes travaux m'ont beaucoup aidé. Je te remercie d'avoir accepté l'expertise de cette thèse, et je sais que tes critiques seront intelligentes et constructives. Trouve ici l'assurance de toute ma considération et de mon amitié.

A Monsieur le Docteur Karl Balabanian. Il arrive rarement au détour d'un congrès de rencontrer une personne convaincue et talentueuse. J'ai beaucoup apprécié nos discussions sur la science et la vie en Toscane, aux côtés de ton patron, Monsieur le Professeur Dominique Emilie, parti trop tôt. Je te remercie sincèrement d'être le rapporteur de cette thèse, et te prie de trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance et de mon amitié.

A Madame le Professeur Francine Behar-Cohen. Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté, non sans enthousiasme, de participer au jury de cette thèse. L'excellence de vos travaux et de votre carrière

m'inspirent un profond respect. Votre expertise et votre esprit m'aideront certainement à améliorer mes travaux. Veuillez trouver ici l'expression de mon respect et de mon admiration.

A Monsieur le Professeur Bahram Bodaghi. Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Votre présence en tant qu'expert en immunologie fondamentale et clinique me paraissait indispensable. J'admire votre implication déterminante dans la formation universitaire ainsi que la recherche en ophtalmologie. Veuillez trouver ici l'expression de mon plus grand respect.

A Madame le Docteur Amanda Proudfoot. Dans ce jury, vous représentez la passerelle entre l'académique et l'industrie. L'étendue de vos travaux témoigne de la complémentarité des structures de recherche publiques et industrielles dont l'étroite collaboration constitue aujourd'hui une force décisive. Veuillez trouver ici l'expression de ma plus grande gratitude.

A toute l'équipe de recherche du Professeur Baudouin, et particulièrement à Madame le Docteur Françoise Brignole-Baudouin. Merci pour ton soutien, ta passion bouillonnante, ta personnalité. Trouve ici, sans aucune convenance, l'expression de mon sincère respect.

A mes amis des Quinze-Vingts, Sylvère Dupont-Monod, Olivier Laplace, Liem Trinh, Charles van Went, Raphaël Adam, Thibault Rodallec. Et à Antoine Labbé qui partage avec moi les joies et les peines qui nourrissent nos ambitions.

A Isabelle, ma raison d'être.

A Ludovic, mon frère que j'aime, à Stéphanie et à Gabriel.

A mes parents, et toute ma famille.

A mes amis, ceux qui ne sont pas sur les « réseaux sociaux », sans hiérarchie : David E, David P-R, Julien, Jérémie, Angéline, Eddy, Gilles, Jean-François, Jérémy, Frédéric, Elodie, Burb, François.

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS	10
INTRODUCTION.....	16
1 LE GLAUCOME	17
1.1 Epidémiologie.....	17
1.2 Elévation de la pression intraoculaire (et autres facteurs de risque)	18
1.3 Physiopathologie trabéculaire	19
1.3.1 Histologie.....	19
1.3.2 Humeur aqueuse et pression intraoculaire.....	20
1.3.3 Trabéculopathie glaucomateuse	23
1.4 Modèles animaux	26
1.4.1 Analyse comparative des différents modèles	27
1.4.2 Modèle par cautérisation des veines épisclérales	28
2 PRINCIPE ET LIMITES THERAPEUTIQUES	30
2.1 Mécanismes d'action des molécules hypotonisantes.....	30
2.1.1 Diminution de la production d'humeur aqueuse	30
2.1.2 Augmentation de la résorption d'humeur aqueuse.....	31
2.2 Limite d'efficacité des traitements hypotonisants.....	32
2.3 Iatrogénicité des traitements.....	33
2.3.1 Notion de Surface oculaire	33
2.3.2 Inflammation de la surface oculaire liée aux conservateurs.....	36
2.3.3 Modèles expérimentaux de toxicité.....	40
3 SYSTEMES CHIMIOKINES/RECEPTEURS.....	42
3.1 Description	42
3.1.1 Chimiokines	42
3.1.2 Récepteurs des chimiokines.....	45

3.1.3	Antagonistes non-peptidiques des récepteurs des chimiokines.....	47
3.2	CXCL12 et ses récepteurs	48
3.2.1	Chimiokine CXCL12.....	48
3.2.2	Récepteurs de CXCL12.....	49
3.2.3	Régulation du système CXCL12/CXCR4	50
3.2.4	CXCL12 et œil.....	53
3.3	CX3CL1 et son récepteur	54
3.3.1	Chimiokine CX3CL1.....	54
3.3.2	Récepteur CX3CR1.....	55
3.3.3	Rôle physiopathologique de CX3CL1.....	55
3.3.4	CX3CL1 et œil.....	56
4	OBJECTIFS GENERAUX	57
	RESULTATS	59
1	IMPLICATION DU CLIVAGE PROTEOLYTIQUE DE CXCL12 DANS LA TRABECULOPATHIE GLAUCOMATEUSE (Article 1)	60
1.1	Synthèse	60
1.2	Objectifs	62
1.3	Méthodologie.....	62
1.4	Résultats.....	64
1.4.1	Expression de CXCL12, SDF-1(5-67) CXCR3 et CXCR4 dans le trabéculum glaucomateux humain et dans une lignée cellulaire trabéculaire glaucomateuse	64
1.4.2	Relations entre CXCL12 et ses récepteurs.....	67
1.4.3	Effets de CXCL12 et SDF-1(5-67) sur la viabilité cellulaire et rôle de CXCR3 et CXCR4 .	69
1.4.4	Effets <i>in vivo</i> des antagonistes non-peptiques spécifiques de CXCR3 et CXCR4 dans un modèle animal de glaucome.	72
2	ROLE DE CX3CL1 DANS L'INFLAMMATION DE LA SURFACE OCULAIRE INDUITE PAR LE CHLORURE DE BENZALKONIUM (article 2)	78
2.1	Synthèse	78
2.2	Objectifs	80

2.3	Méthodologie.....	80
2.4	Résultats.....	82
2.4.1	Expression conjonctivale de CX3CL1 chez les patients glaucomateux bénéficiant d'un traitement contenant du BAC.....	82
2.4.2	Expression basale et inducible de CX3CL1/CX3CR1 in vitro.....	83
2.4.3	Effet chimiotactique in vitro des cellules épithéliales conjonctivales via CX3CL1/CX3CR1.....	85
2.4.4	Migration conjonctivale des cellules inflammatoires chez la souris KO pour CX3CR1 en réponse au chlorure de benzalkonium.....	87
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	90
	PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	103
1	BREVET.....	104
2	ARTICLES SOUMIS POUR PUBLICATION.....	123
2.1	Article 1.....	123
2.2	Article 2.....	153
3	COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....	183
	REFERENCES.....	184

Liste des abréviations

ARNm: Acide ribonucléique messenger
BAC: Chlorure de benzalkonium
CMF: Cytométrie en flux
DMLA: Dégénérescence maculaire liée à l'âge
DMEM: Milieu eagle modifié de Dulbecco
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
FBS: Sérum de veau fœtal
FITC: Fluorescéine-isothiocyanate
GPAO: Glaucome primitif à angle ouvert
GPCR : récepteur couplé aux protéines G
HLA: Human leukocyte antigen
HTO: Hypertonie oculaire
IF : immunofluorescence
IL: interleukine
INF: Interféron
Ig: Immunoglobuline
IP: Iodure de propidium
KO: knock out
MEC: Matrice extracellulaire
MMP: Métalloprotéinase matricielle
NK: lymphocytes « natural killer »
PBS: Phosphate buffer saline
PCR: polymérase chain reaction
PEFL: portion effective de zone de filtration trabéculaire
PFA: Paraformaldéhyde
PIO: Pression intraoculaire
RT-PCR: Reverse transcriptase polymérase chain reaction
SDF-1: Stromal cell derived factor 1
SNC: système nerveux central
TGF: Transforming growth factor
TIMP: Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases
TNF: Tumor necrosis factor

AVANT-PROPOS

Le glaucome est une pathologie ophtalmologique fréquente qui représente aujourd'hui un enjeu majeur de santé publique. Cette maladie concerne plus de 70 millions de personnes dans le monde et conduit à la cécité dans environ 10% des cas. Elle représente ainsi la seconde cause de cécité mondiale et la première cause de cécité irréversible (*Quigley 2006, Cedrone 2008*).

Schématiquement, le glaucome primitif à angle ouvert (GPAO) est une neuropathie optique dont le premier facteur de risque est une élévation pathologique de la pression intraoculaire (PIO) (*Sommer 1989*). L'hypertonie oculaire (HTO), qui contribue à l'initiation ainsi qu'à la progression du GPAO, semble résulter de modifications pathologiques de la voie de résorption de l'humeur aqueuse au niveau d'une entité oculaire spécifique : le trabéculum. Alors que la neuropathie glaucomateuse fait l'objet de très nombreuses études cliniques et fondamentales, très peu de choses sont connues sur la pathologie trabéculaire initiale. Certains travaux de notre équipe et d'autres ont révélé que le trabéculum glaucomateux présentait une raréfaction des cellules trabéculaires, un remodelage de la matrice extracellulaire (MEC), ainsi qu'une infiltration discrète par des cellules inflammatoires (*Alvarado 1984, Rohen 1984, Grierson 1987, Hamard 2002*). Aujourd'hui, les mécanismes physiopathologiques qui déterminent une telle dégénérescence trabéculaire -morphologique et fonctionnelle- ne sont pas identifiés. Cette « trabéculopathie glaucomateuse », *primum movens* de la maladie, demeure ainsi inaccessible aux traitements actuels.

Malgré les progrès médicaux développés contre la pathologie glaucomateuse, une certaine proportion de patients résiste progressivement aux traitements (*Kass 2002*). On assiste ainsi à une aggravation de la neuropathie en dépit d'une séquence thérapeutique moderne bien définie consistant à instaurer une monothérapie, puis à combiner deux, trois, voire quatre molécules actives aux effets complémentaires. Cet échappement thérapeutique, souvent caractérisé par l'association d'une augmentation progressive de la PIO au développement de la neuropathie, pourrait trouver une explication dans le mécanisme même des traitements actuels. Les principes actifs utilisés visent à diminuer la PIO – en réduisant la synthèse de l'humeur aqueuse ou en augmentant la résorption – mais ne ciblent pas directement la trabéculopathie originelle. Nous pourrions formuler l'hypothèse que l'altération pathologique du trabéculum progresse en dépit d'un traitement hypotensif adapté, conduisant à une reprise de l'HTO de plus en plus réfractaire aux mesures médicales (**Figure 1**). La compréhension des mécanismes biochimiques et cellulaires qui régissent le microenvironnement trabéculaire

permettrait de développer des méthodes thérapeutiques ciblées contre la pathologie trabéculaire initiale.

En outre, les stratégies thérapeutiques mises en place dans cette affection nécessitent l'administration quotidienne et au long cours d'un ou plusieurs traitements. Les collyres antiglaucomateux, qui incluent généralement un conservateur associé au principe actif, sont responsables de troubles chroniques au niveau de l'interface lacrymo-cornéo-conjonctival : la surface oculaire (Baudouin 2008, Baudouin 2010). Plus de la moitié des patients bénéficiant d'un traitement antiglaucomateux au long cours présente des signes fonctionnels d'intolérance souvent associés à des lésions cliniques avérées de la surface oculaire d'origine iatrogène (**Figure 1**). Ces mécanismes d'intolérance concourent ainsi à une diminution de l'observance thérapeutique, donc à l'inefficacité éventuelle de notre prise en charge.

Des études cliniques et fondamentales notamment conduites par notre équipe ont permis de démontrer que les conservateurs, au premier rang desquels figure le chlorure de benzalkonium (BAC), sont responsables d'une toxicité aigüe et chronique au niveau de la surface oculaire : au delà de ses propriétés surfactantes qui altèrent la qualité du film lacrymal, le BAC est directement responsable d'une rupture de la barrière épithéliale, d'une apoptose des cellules épithéliales, et d'une inflammation de la surface oculaire (Sherwood 1989, De Saint Jean 1999, Baudouin 2004). L'imagerie *in vivo* –comme la microscopie confocale- associée à l'étude cellulaire *ex vivo* de la surface oculaire - grâce à la technique des empreintes conjonctivales - ont ainsi révélé que l'exposition au BAC induisait une surexpression de marqueurs de l'inflammation ainsi qu'une infiltration de la conjonctive par des cellules immunitaires. Néanmoins, l'origine d'une telle infiltration inflammatoire, qu'elle soit simplement secondaire à une destruction tissulaire, ou bien si spécifiquement liée à des propriétés proinflammatoires du BAC encore inconnues, n'est pas aujourd'hui établie.

Les chimiokines sont des cytokines de faible poids moléculaire qui se lient à des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Les premières chimiokines identifiées il y a une vingtaine d'années étaient initialement caractérisées par leur puissant effet chimioattractant sur certaines populations leucocytaires, conduisant à la migration et l'activation des cellules de l'immunité sur les sites inflammatoires (Wolpe 1989, Horuk 2001). Les systèmes chimiokines/récepteurs sont fondamentalement caractérisés par une importante redondance, *i.e.* l'affinité de chaque chimiokine pour plusieurs récepteurs et réciproquement. Leurs effets, ainsi que leur étude, sont donc intriqués et complexes. Certains d'entre eux dérogent

cependant à la règle, telle CX3CL1 (fractalkine) qui se lie à un unique GPCR spécifique : CX3CR1 (*Bazan 1997, Imai 1997*). Ses capacités d'attraction et d'activation de certaines sous-population leucocytaires, particulièrement les monocytes /macrophages et les lymphocytes NK, ont été mises en cause dans certaines pathologies inflammatoires ou dysimmunes comme la polyarthrite rhumatoïde, la dermatite atopique, l'encéphalopathie à VIH et l'athérosclérose (*Rimaniol 2003, Combadiere 2003*). En ophtalmologie, il a été récemment montré que le polymorphisme de CX3CR1 pourrait être en cause dans l'accumulation rétinienne microgliale au cours de la DMLA (*Combadiere 2007*), ainsi que dans le trafic des cellules dendritiques au niveau de la cornée (*Chinnery 2008*).

Plus récemment, il a été mis en évidence qu'un certain nombre de systèmes chimiokines/récepteurs étaient impliqués dans des processus extra-immunitaires. Les chimiokines agissent de façon autocrine ou paracrine, c'est-à-dire dans l'environnement cellulaire immédiat. Elles sont ainsi en mesure d'assurer la communication intercellulaire et de réguler les interactions entre les cellules et le milieu extracellulaire dans leur environnement proche. D'une part, de nombreuses études dans le domaine des neurosciences nous ont appris que certaines chimiokines jouent un rôle clé dans le développement du système nerveux, la régulation de l'environnement neuro-glial, la communication neuronale et la neuromodulation pré- et post-synaptique (*Rostène 2011, Rostène 2007*). D'autre part, il a été récemment montré que les chimiokines étaient impliquées dans la régulation de l'homéostasie tissulaire, depuis le contrôle de la viabilité cellulaire jusqu'au remodelage de la MEC.

Ces observations posent aujourd'hui les fondements de modèles de contrôle tissulaire physiologiques, comme l'angiogénèse, ou pathologiques, comme la croissance tumorale, dans lesquels entrent en jeu les chimiokines. C'est le cas particulièrement de CXCL12, antérieurement appelé SDF-1, et de son principal récepteur CXCR4. Outre ses propriétés au sein du système immunitaire, CXCL12 joue un rôle spécifique dans le maintien de l'homéostasie des niches de cellules souche, dans la régulation de la MEC et dans la migration et la survie des cellules cancéreuses (*Muller 2001, Lapidot 2005, Li 2008*). Récemment, il a été démontré que le clivage de CXCL12 par des métalloprotéinases (MMPs) en une forme tronquée nommée SDF-1(5-67) était responsable de mort cellulaire par l'intermédiaire d'un autre GPCR, le CXCR3 (*McQuibban 2001, Vergote 2006*). Ainsi l'environnement extracellulaire, comme la composition de la MEC ou la présence de médiateurs de l'inflammation et de MMPs, pourrait conditionner la fonction de CXCL12 en

modifiant son affinité pour certains récepteurs, constituant ainsi une voie déterminante de régulation de la fonction d'homéostasie de cette chimiokine.

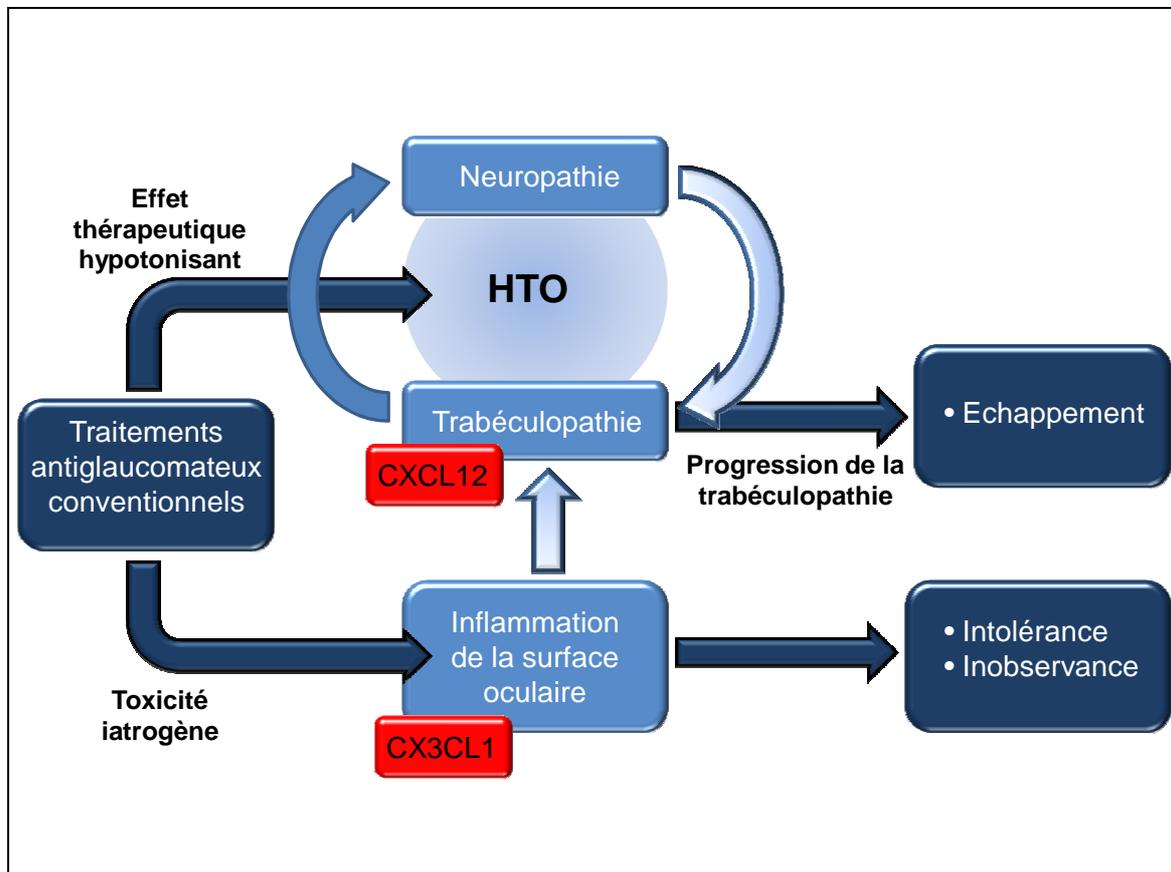


Figure 1: Modélisation de la problématique des traitements actuels dans la pathologie glaucomateuse. (1) Les traitements antiglaucomateux actuels visent à diminuer la PIO mais ne ciblent pas directement la trabéculopathie dont la progression pourrait expliquer l'échappement thérapeutique rencontré en pratique clinique. (2) L'administration au long cours de collyres conservés est responsable de troubles chroniques de la surface oculaire qui nuisent à la tolérance et l'observance du traitement. Nos axes de recherches portent sur l'implication de CXCL12 dans la physiopathologie trabéculaire et celle de CX3CL1 dans l'inflammation de la surface oculaire d'origine iatrogène. (Les flèches dégradées représentent des hypothèses non encore démontrées, notamment l'éventuelle influence directe ou indirecte de l'inflammation de la surface oculaire sur la trabéculopathie glaucomateuse)

Les problèmes thérapeutiques rencontrés aujourd'hui dans le cadre de la maladie glaucomateuse soulèvent certaines interrogations. En premier lieu, on comprend aisément que la mise à jour des mécanismes cellulaires qui régissent la trabéculopathie glaucomateuse pourrait permettre d'ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques spécifiques. Les altérations trabéculaires constatées au cours du glaucome –apoptose (*Baleriola 2008*), inflammation et

remaniement de la MEC - nous ont amenés à formuler l'hypothèse selon laquelle CXCL12, sa forme tronquée SDF-1(5-67), et certains GPCRs pourraient être impliqués dans cette trabéculopathie. Nous avons ainsi étudié l'axe CXCL12 sur tissus humains, sur lignées cellulaires immortalisées, ainsi que sur un modèle animal de glaucome, en recourant à l'utilisation d'antagonistes non-peptidiques spécifiques de certains GPCRs.

En second lieu, nous avons souhaité étudier les mécanismes responsables de l'inflammation de la surface oculaire constatée au cours de traitement par des collyres antiglaucomateux contenant ou non du BAC. Des résultats précédents nous ont conduits à formuler l'hypothèse selon laquelle CX3CL1 pourrait être impliquée dans l'interaction cellulaire entre l'épithélium conjonctival exposé au BAC et certaines sous-populations leucocytaires. La chimiokine CX3CL1 a été étudiée chez l'homme, sur lignées cellulaires immortalisées, ainsi que sur un modèle animal de toxicité oculaire chez des souris transgéniques KO pour son récepteur, le CX3CR1.

INTRODUCTION

1 LE GLAUCOME

Le glaucome représente un groupe de neuropathies optiques progressives ayant en commun une dégénérescence progressive des cellules ganglionnaires de la rétine et de leurs axones, se traduisant par une excavation de la tête du nerf optique et par une atteinte du champ visuel. L'élévation de la PIO est le premier facteur de risque reconnu du glaucome. Ses fondements biologiques ainsi que les autres facteurs de risque impliqués dans cette affection ne sont cependant pas encore totalement élucidés (*Weinreb 2004*).

En fonction de l'examen clinique ophtalmologique, de l'anatomie de l'angle irido-cornéen, de l'aspect du nerf optique et de l'existence d'une atteinte du champ visuel de type glaucomateuse, les glaucomes sont classés en (*European-Glaucoma-Society 2003*):

- **Glaucomes congénitaux**
- **Glaucomes à angle ouvert (GAO) :**
 - **Glaucomes primitifs à angle ouvert (GPAO) et hypertonie oculaire (HTO).** L'HTO correspond à une élévation de la PIO sans signe d'atteinte du nerf optique ou du champ visuel. Le GPAO est une neuropathie optique généralement précédée puis associée à une HTO.
 - **Glaucomes secondaires à angle ouvert :** ils peuvent être liés à des maladies oculaires (glaucome pseudo-exfoliatif, pigmentaire, uvéitique, traumatique, phaco-antigénique,...), iatrogènes (corticostéroïdes, post chirurgicaux,...), ou à des causes extraoculaires comme le glaucome par augmentation de la pression veineuse épisclérale.
- **Glaucomes à angle fermé:**
 - Glaucomes primitifs à angle fermé.
 - Glaucomes secondaires à angle fermé.

L'ensemble de nos travaux concerne le GPAO hypertensif qui représente aujourd'hui la grande majorité des patients glaucomateux dans nos pays et constitue un modèle de trabéculopathie primitive dont la physiopathologie demeure inconnue.

1.1 Epidémiologie

Le glaucome est une cause majeure de cécité et représente un problème de santé publique au niveau mondial puisqu'il toucherait entre 67 et 90,8 millions d'individus (*Weinreb 2000*;

Villain 2005; Nduaguba 2006). Le GPAO est le plus fréquent des glaucomes en occident et en Afrique, où il représente, en fonction des régions et critères diagnostiques, 50 à 70% de l'ensemble des glaucomes. Dix pour cent des patients atteints de glaucome présenteraient une cécité bilatérale liée à cette neuropathie optique (*Quigley 1996*). Dans les pays développés, le GPAO représente l'une des trois premières causes de cécité avec la rétinopathie diabétique et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).

La prévalence de la maladie est de 0,5 à 1% dans une population d'adultes de plus de 40 ans, en Europe et en Amérique du Nord. Ce chiffre contraste avec la fréquence de l'HTO atteignant 5 à 10% de la même population (*Kahn 1980*). La prévalence du glaucome augmente avec l'âge. Elle est variable chez les caucasiens selon les publications, de 1,8% dans l'étude Baltimore réalisée chez des caucasiens de plus de 60 ans (*Sommer. 1991*), à 3,4% dans l'étude Beaver Dam chez des patients de plus de 65 ans (*Klein 1992*). En France, le glaucome toucherait environ 1 200 000 personnes et l'on estime qu'à peu près la moitié des glaucomes n'est pas diagnostiquée (*Bron 2006*).

1.2 Elévation de la pression intraoculaire (et autres facteurs de risque)

Le glaucome est une maladie neurodégénérative caractérisée par une dégénérescence progressive des cellules ganglionnaires rétiniennes par apoptose (*Weinreb 2004*). Les mécanismes précis qui déclenchent cette mort cellulaire ne sont pas encore élucidés, mais cette apoptose des cellules ganglionnaires de la rétine entraîne une excavation caractéristique de la tête du nerf optique et une atteinte du champ visuel. Plusieurs mécanismes sont probablement à l'origine de cette neuropathie optique, et il est très probable qu'ils interagissent à des degrés variables pour des individus différents (*Mackenzie 2008*).

L'élévation de la PIO liée à une augmentation des résistances à l'élimination de l'humeur aqueuse de la chambre antérieure de l'œil demeure le principal facteur de risque du glaucome (*Gordon 2002; Mansberger 2006*). L'aspect des nerfs optiques et des champs visuels sont déterminés par le niveau de PIO et surtout par la tolérance des axones des cellules ganglionnaires à cette PIO ainsi qu'à ses fluctuations (*Mackenzie 2008*). La réponse des tissus de la tête du nerf optique au stress lié à une élévation de la PIO, outre des phénomènes mécaniques, impliquent des modifications vasculaires, une activation gliale et un remodelage tissulaire qui interagissent entre eux (*Mackenzie 2008*). De nombreuses études cliniques mais

aussi expérimentales ont montré le rôle possible d'anomalies du flux sanguin oculaire dans la neuropathie optique glaucomateuse (*Mackenzie 2008*). Le tissu glial comme les astrocytes et la microglie pourraient également avoir un rôle central dans la transformation du stress lié à l'augmentation de la PIO en une réponse cellulaire responsable d'un remodelage tissulaire. Des changements au niveau des molécules d'adhésion cellulaire, des cytokines, des facteurs neurotrophiques et des marqueurs du stress oxydant se produiraient de manière privilégiée au niveau de la glie et joueraient un rôle central dans la réponse biologique à ce stress mécanique (*Hernandez 2000*). Enfin, l'atteinte des cellules ganglionnaires rétiniennes pourrait également avoir une origine auto-immune (*Wax 1998*).

1.3 Physiopathologie trabéculaire

1.3.1 Histologie

Le trabéculum est une entité morpho-fonctionnelle complexe située au niveau de l'angle irido-cornéen, en avant de la racine de l'iris (**Figure 2**). Il s'agit d'une bande triangulaire dont le sommet antérieur s'insère sur l'anneau de Schwalbe et la base postérieure s'étend de l'éperon scléral à la racine de l'iris. Prolongeant l'endothélio-Descemet cornéen et parallèle au limbe scléro-cornéen, le trabéculum tapisse l'angle irido-cornéen sur la totalité de sa circonférence. C'est un tissu conjonctif lacunaire, composé d'un empilement de lamelles entourées de cellules endothéliales, situé en avant du mur interne du canal de Schlemm et formant des espaces intertrabéculaires de plus en plus minces en approchant de la lumière canalaire. Le trabéculum n'est pas vascularisé et sa nutrition est assurée par l'humeur aqueuse (*Bechetoille 1997; Romanet 1998*). L'analyse histologique décrit quatre constituants principaux du trabéculum: Le trabéculum cribiforme ou juxtacanaliculaire, le trabéculum scléral, le trabéculum uvéal et les procès ou trabécules iriens.

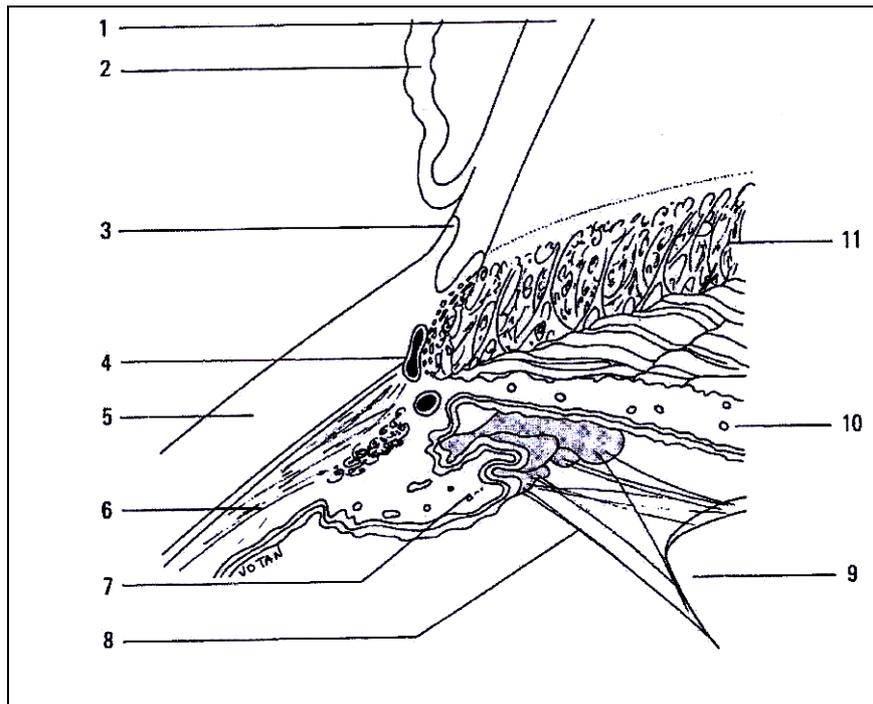


Figure 2: L'angle irido-cornéen (Image P. Vo Tan in Ganem 1992). 1, cornée; 2, conjonctive; 3, éperon scléral; 4, canal de Schlemm; 5, sclère; 6, muscle ciliaire; 7, corps ciliaire; 8, zonule; 9, cristallin; 10, iris; 11, trabéculum.

Le trabéculum cribiforme est la partie la plus externe du trabéculum et le principal site de résistance de l'écoulement de l'humeur aqueuse dans le glaucome à angle ouvert (GAO) (Bechetoille 1997; Romanet 1998). Il se situe entre le mur interne du canal de Schlemm et le trabéculum cornéo-scléral. Mesurant 5 à 10 μm , le trabéculum cribiforme est formé d'un tissu conjonctif lâche, sans stratification, et de deux à cinq couches de cellules endothéliales (dites trabéculaires) disposées de manière aléatoire, au sein d'une substance fondamentale ou matrice extracellulaire (MEC). Les cellules trabéculaires possèdent un cytoplasme riche en ribosomes et en appareils de Golgi, ainsi qu'une capacité importante de phagocytose par vacuolisation et de très nombreux récepteurs membranaires (Romanet 1998).

1.3.2 Humeur aqueuse et pression intraoculaire

L'humeur aqueuse est le liquide qui remplit les chambres antérieures et postérieures de l'œil. Elle est le déterminant le plus important de la PIO. En outre, elle assure également une fonction métabolique nutritionnelle et d'élimination des déchets pour le cristallin, la cornée et le trabéculum (Bechetoille 1997; Romanet 1998). Formée à partir du plasma au niveau des

procès ciliaires du corps ciliaire, elle va être éliminée au niveau de l'angle irido-cornéen par la voie principale trabéculo-canaliculaire et par les voies accessoires uvéosclérales.

1.3.2.1 Synthèse de l'humeur aqueuse

L'humeur aqueuse provient du sang mais sa composition est bien différente, les deux liquides biologiques étant séparés par la barrière hémato-aqueuse. Celle-ci est constituée de l'ensemble des structures uvéales qui séparent le sang des capillaires iriens et ciliaires de l'humeur aqueuse.

L'eau est le principal constituant de l'humeur aqueuse (99,6%). Parmi les autres constituants, certains ont des concentrations plus faibles que dans le sang:acides aminés, protéines de structure, enzymes, glucose, urée, acide urique, créatinine et bicarbonates; d'autres ont des concentrations plus élevées :sodium, chlorure, acide ascorbique, acide lactique; d'autres ont des concentrations voisines de celles du sang :potassium, calcium, phosphates.

La formation de l'humeur aqueuse a lieu principalement au niveau des procès ciliaires qui sont au nombre de 70 à 80. Chaque procès ciliaire est centré sur une artériole, branche du grand cercle artériel de l'iris. Ils représentent le principal point de passage dans la BHA à l'origine de 90% du flux d'humeur aqueuse (*Bechetoille 1997; Romanet 1998*). Au niveau de l'épithélium ciliaire, plusieurs mécanismes physiologiques vont permettre aux éléments sanguins présents dans le stroma et les espaces intercellulaires de traverser la BHA afin de produire l'humeur aqueuse dans la chambre postérieure:ils impliquent de la diffusion simple, de la diffusion facilitée, de l'ultrafiltration, et du transport actif qui reste le mécanisme le plus important dans la formation de l'humeur aqueuse (*Bechetoille 1997; Romanet 1998*).

Le débit d'humeur aqueuse serait de l'ordre de 2,75 µl/min (*Brubaker 1991*) ce qui correspond à un renouvellement de 1% par minute du volume qu'elle occupe dans le segment antérieur. Le renouvellement complet se faisant en moins de deux heures (*Bechetoille 1997; Romanet 1998*). La sécrétion d'humeur aqueuse n'est pas constante tout au long du nyctémère, elle dépend d'un rythme circadien avec une diminution du taux de sécrétion la nuit de l'ordre de 30% (1,50µl/mn), voire 50% (*Bechetoille 1997; Romanet 1998; Blaise 2005; Renard 2005*). Le mécanisme précis de cette variation reste inconnu tout comme les facteurs exacts influençant la régulation de la sécrétion d'humeur aqueuse (*Romanet 1998*).

1.3.2.2 Elimination de l'humeur aqueuse

L'humeur aqueuse va être éliminée de la chambre antérieure au niveau de l'angle irido-cornéen par deux voies (*Romanet 1998*). La voie principale trabéculo-canaliculaire, par le

trabéculum, le canal de Schlemm et ses canaux efférents, est responsable de 90 % de son évacuation. Les voies uvéosclérales sont des voies dites accessoires et représentent environ 10% de l'évacuation de l'humeur aqueuse (*Bechetoille 1997; Romanet 1998*).

Voie trabéculaire. L'élimination de l'humeur aqueuse par la voie principale trabéculaire nécessite son passage depuis la chambre antérieure de l'œil au travers du trabéculum uvéal, du trabéculum cornéo-scléral et du trabéculum juxtacaniculaire ou cribriforme. L'humeur aqueuse passe ensuite dans le canal de Schlemm dont la paroi externe donne naissance à des canaux collecteurs efférents. Ces canaux s'anastomosent en un plexus veineux intrascléral profond puis épiscléral, pour enfin drainer l'humeur aqueuse dans les plexus veineux extraoculaires. Dans l'HTO et le GAO, c'est essentiellement le trabéculum cribriforme et l'endothélium du canal de Schlemm qui sont à l'origine de l'excès de résistance à l'écoulement de l'humeur aqueuse (*Seiler 1985; Ethier 1986; Allingham 1992*).

Voie uvéosclérale. L'absence de barrière épithéliale au niveau de l'angle irido-cornéen, entre la chambre antérieure et le corps ciliaire, permet à l'humeur aqueuse d'entrer dans le corps ciliaire à travers la racine de l'iris et ainsi court-circuiter le trabéculum et le canal de Schlemm. L'humeur aqueuse peut ainsi passer de manière passive entre les faisceaux musculaires et gagner les espaces supra-ciliaires et supra-choroïdiens, et enfin la sclère (*Bechetoille 1997; Romanet 1998*). A l'extérieur de l'œil, l'humeur aqueuse est soit réabsorbée par les vaisseaux sanguins orbitaires, soit drainée par les vaisseaux lymphatiques de la conjonctive (*Romanet 1998*). Ces voies représentent 5 à 15% de l'élimination de l'humeur aqueuse, et en condition physiologique, le débit est estimé à 0,2 à 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ avec peu de variations induites par la PIO (*Bechetoille 1997; Romanet 1998*). L'élimination de l'humeur aqueuse par cette voie semble dépendre de l'état du muscle ciliaire, essentiellement sous influence sympathique. L'élimination d'humeur aqueuse augmente lorsque le muscle ciliaire se relâche ce qui élargit les espaces intramusculaires, et elle diminue lorsque le muscle ciliaire se contracte (*Bechetoille 1997; Romanet 1998*). Notons tout de même une très grande variabilité du débit uvéoscléral mesuré, dont la proportion s'étendrait de 4% à 54% de la filtration totale selon les études (*Bill 1971, Toris 1995*).

1.3.2.3 Régulation de la pression intraoculaire

Relation entre PIO et renouvellement de l'humeur aqueuse. Une pression est une force qui se répartit uniformément sur une surface. La PIO résulte de l'équilibre qui s'établit entre le contenu du globe oculaire et son contenant (*Bechetoille 1997*). L'humeur aqueuse reste le facteur déterminant essentiel de la PIO qui résulte de l'équilibre entre sa sécrétion et son

élimination. La relation entre ces facteurs détermine la PIO dans l'œil normal comme le résume parfaitement la formule de Goldmann (*Bechetoille 1997*):

$$\text{PIO} = (\text{F}/\text{C}) + \text{Pve} \quad (1)$$

dans laquelle PIO est la pression intraoculaire en mm Hg, F est le débit de formation de l'humeur aqueuse exprimé en $\mu\text{l}/\text{min}$, C est le débit d'élimination exprimé en $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mm Hg}$, et Pve représente la pression veineuse épisclérale exprimée en mm Hg. La résistance à l'évacuation de l'humeur aqueuse est l'inverse du débit d'élimination. Chez les caucasiens, la PIO moyenne a donc été définie comme la moyenne \pm deux écarts-types, soit $15,2 \pm 3,25$ mm Hg (*Romanet 1998*). De très nombreux facteurs, ethniques, génétiques, hormonaux, dynamiques, hémodynamiques ou encore biologiques peuvent influencer la PIO et confirment la complexité de sa régulation.

Equation dynamique du renouvellement de l'humeur aqueuse. La dynamique de renouvellement de l'humeur aqueuse peut-être représentée par l'équation de Goldmann (*Brubaker 2004*) :

$$\text{F}_{\text{ah}} = \text{F}_{\text{u}} + \text{F}_{\text{t}} \quad (2)$$

F_{ah} [$\mu\text{l}/\text{min}$] :débit de synthèse de l'humeur aqueuse ; F_{u} [$\mu\text{l}/\text{min}$] :débit uvéoscléral ; et F_{t} [$\mu\text{l}/\text{min}$] :débit trabéculaire.

$$\text{F}_{\text{t}} = \text{C} \times (\text{PIO} - \text{PEV}) \quad (3)$$

C [$\mu\text{l}/\text{min}/\text{mmHg}$] :facilité à l'écoulement aqueux trabéculaire ; et PEV [mmHg] :pression des veines épisclérales. La facilité de l'écoulement à l'humeur aqueuse chez l'homme varie de 0,1 à 0,4 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mmHg}$.

1.3.3 Trabéculopathie glaucomateuse

1.3.3.1 Altérations histologiques et cellulaires

Peu de choses sont connues concernant les altérations morphologiques et fonctionnelles du trabéculum dans le GPAO. Les études anatomopathologiques précédemment publiées par notre équipe et d'autres (**Figure 3**) ont montré :

- *Une raréfaction des cellules trabéculaires (probablement liée à une apoptose)*
- *Une altération des jonctions intercellulaires*
- *Un remodelage des fibres de collagène au sein de la MEC*
- *Une discrète infiltration tissulaire par des cellules inflammatoires (inconstante)*

De façon générale, les modifications trabéculaires au cours du glaucome ressemblent à une dégénérescence tissulaire liée à l'âge et associent un remodelage et une accumulation de MEC à une diminution de la cellularité trabéculaire (Alvarado 1984, Rohen 1993, Grierson 1987). Les cellules trabéculaires présentent des propriétés phagocytiques et régulent la composition de la MEC en synthétisant des MMPs ainsi que des glycosaminoglycanes, particulièrement des chondroïtine-sulfates (Sherwood 1988, Hernandez 1987). Ainsi, la perte de cellules trabéculaires serait associée à des altérations morphologiques trabéculaires comme l'amincissement/fusion tissulaires et l'accumulation de MEC dans l'endothélio-Schlemm (Alvarado 1984). Il a été précédemment démontré que certaines cytokines –comme le TNF- α , l'IL-1 β , ou le TGF- β 1/2 – pouvaient modifier ces fonctions cellulaires (Fuchshofer 2003, Wordinger 98, Samples 1993). Parallèlement, les stress hyperbare ou oxydatif influenceraient aussi la synthèse protéique des cellules trabéculaires (Li 2007). Au cours du glaucome, des concentrations anormalement élevées de certaines MMPs –MMP-2 et MMP-3 particulièrement-, de TNF- α , et de TGF- β 2 au sein du tissu trabéculaire ont été retrouvées (Acoot 2008, Alexander 2001, Hosseini 2006).

Il est important de noter qu'une apoptose trabéculaire a été détectée de façon significative au sein des trabéculums de patients atteints de glaucome, ce phénomène apparaissant comme spécifique du GPAO comparativement aux autres types de glaucome (Baleriola 2008). Néanmoins, les mécanismes initiaux conduisant à cette mort cellulaire demeurent encore mal connus. Seuls les effets du stress oxydatif ont été largement étudiés (De La Paz 1996, Sacca 2007, Frenandez-Durango 2008). Il a été ainsi observé qu'une surexpression des espèces réactives de l'oxygène au sein du trabéculum entraînait une perte de fonction trabéculaire associée à une élévation de la résistance à l'écoulement et de la PIO (Caballero 2003, Luna 2009, Izzotti 2006, Sacca 2008, Ohia 2005). Au niveau cellulaire, ce stress oxydatif conduirait à une dégénérescence par accumulation de débris intracellulaires en relation avec une perte de fonction du protéasome (Babizhayev 1989, Zanon-Moreno 2008, Gasirowskia 2009, Caballero 2003, Luna 2009). Ainsi, une sous-expression du gène miR-29b –lié à la synthèse

de certains composants de la MEC- ainsi qu'un variant de GSTM1 –gène mitochondrial impliqué dans la défense oxydative – ont été incriminés dans la physiopathologie de la dégénérescence trabéculaire (Luna 2009, Izzotti 2010). Notons enfin que la surexpression du TGF- β 2 retrouvée dans le segment antérieur des patients glaucomateux pourrait participer à la trabéculopathie, cette molécule étant largement impliquée dans les réactions de fibrose tissulaire (Fuchshofer 2009) ainsi que la peroxydation lipidique et la production d'espèces réactives de l'oxygène (Yu 2010).

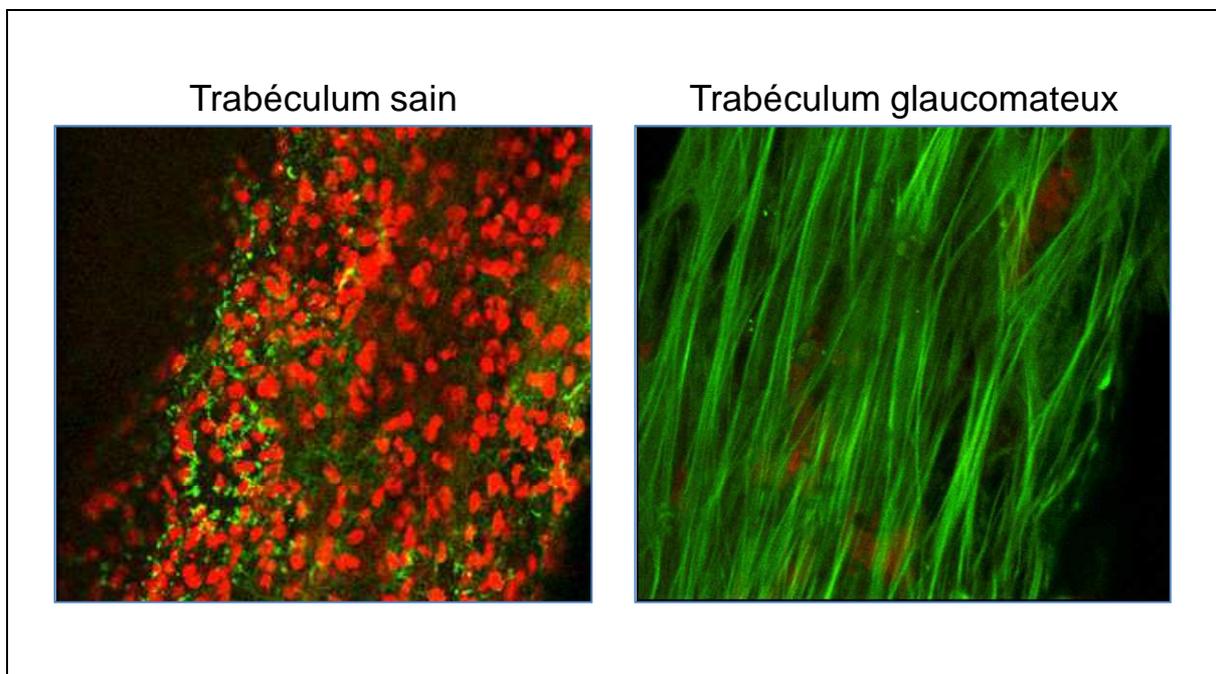


Figure 3: Etude histologique comparative de trabéculum humains en microscopie confocale (Hamard 2002). Le trabéculum glaucomateux présente une raréfaction extrême des cellules trabéculaires ainsi qu'un remaniement de la MEC. (Les noyaux cellulaires sont colorés en IP (rouge), les fibres d'élastine sont autofluorescentes (vert), $\times 200$).

1.3.3.2 Altérations fonctionnelles

L'étude de la fonction trabéculaire chez l'homme demeure complexe et limitée par l'imprécision des méthodes de mesure *in vivo* actuelles. Cependant, le recours à la fluorophotométrie *in vivo* a permis de mieux étudier la dynamique du renouvellement de

l'humeur aqueuse au cours du GPAO (*Toris J Glaucoma 2007, Lim 2008*). Les modifications rapportées sont :

- *La diminution progressive du volume de la chambre antérieure avec l'âge, indépendante de la PIO*
- *L'absence de variation de synthèse d'humeur aqueuse*
- *La diminution du débit de filtration trabéculaire, retrouvée systématiquement en cas de GPAO, et directement proportionnelle à l'élévation de la PIO*

Enfin, le débit de la voie uvéosclérale, toujours évalué de façon indirecte, serait normal ou diminué en cas de GPAO.

1.4 Modèles animaux

Le développement de modèles animaux d'HTO et de glaucome constitue encore aujourd'hui un des enjeux majeurs de la recherche expérimentale dans cette pathologie. La mise au point de modèles fiables est nécessaire à la compréhension de la physiopathologie comme à l'évaluation du potentiel thérapeutique de nouvelles molécules.

Le modèle idéal devrait remplir les critères suivants :

- *La robustesse*, garante de l'obtention d'une HTO élevée et stable dans le temps
- *L'efficacité*, qui correspond ici à l'obtention d'une proportion élevée d'animaux malades suite à la procédure expérimentale
- *La reproductibilité intra-opérateur* (dans le temps) et *inter-opérateur*, qui implique souvent la mise au point de protocoles simples et réalisables en routine.
- *L'obtention d'un phénotype morpho-fonctionnel se rapprochant le plus de la pathologie humaine.*

1.4.1 Analyse comparative des différents modèles

Différentes stratégies permettent d'aboutir à une HTO chez l'animal. Il est possible de réaliser soit une obstruction trabéculaire, soit une obstruction d'aval au niveau épiscléral, soit les deux (Tableau 1).

Pendant de nombreuses années, les études ont assumé empiriquement l'interchangeabilité de ces modèles. Aujourd'hui, l'amélioration des méthodes d'imagerie –comme l'OCT de segment antérieur et l'UBM- et le recours à de nouveaux traceurs de fonctionnalité trabéculaire, permettent de mieux appréhender l'existence de différences fondamentales parmi ces modèles.

Tableau 1 : Classification des différents modèles animaux de glaucome associé à une HTO.

Modèle	Niveau d'obstruction	Caractéristiques	Références
Souris DBA/2j	Obstruction trabéculaire par dispersion pigmentaire (atrophie irienne)	<ul style="list-style-type: none"> • Modèle de glaucome pigmentaire obstructif • Faible HTO • Variabilité élevée 	<p><i>Chang et al. Nat Genet 1999</i></p> <p><i>John et al, IOVS 1998</i></p> <p><i>Reichstein et al, Exp eye Res 2007</i></p> <p><i>Inman et al, IOVS 2006</i></p>
Photocoagulation trabéculaire (rongeurs, singe)	Obstruction trabéculaire par photodestruction	<ul style="list-style-type: none"> • Efficacité élevée chez le singe • Espèce animale contraignante • Pas d'étude possible de la physiopathologie trabéculaire (destruction physique directe) 	<p><i>Ghasterland et al. IOVS 1974</i></p> <p><i>Radisu et al. ARch Ophth 1984</i></p> <p><i>Zhang et al, exp eye res 2009</i></p> <p><i>Levkovitch-Verbin et al, IOVS 2002</i></p> <p><i>Ueda et al, Jpn J Ophthalmol 1998</i></p>
Obstruction trabéculaire par microbilles (rat, singe)	Obstruction trabéculaire	<ul style="list-style-type: none"> • Efficacité pour l'HTO aigüe • Variabilité à moyen terme • Etude morphologique du trabeculum altérée par la présence des billes 	<p><i>Weber et al. J NeuroScience methods 2001</i></p> <p><i>Urcola et al, Exp eye Res 2006</i></p>

<p>Injection épisclérale de sérum hypertonique (rat)</p>	<p>Obstruction épisclérale ET destruction trabéculaire</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Altérations morphologiques importantes (élargissement de la CA et destruction des procès ciliaires) 	<p><i>Morrison et al, exp eye Res 1997</i></p> <p><i>Guo et al, IOVS 2005</i></p>
<p>Occlusion des veines épisclérales par ligature ou cautérisation (rat)</p>	<p>Obstruction épisclérale (voie trabéculaire ± voie uvéosclérale)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Obtention d'une HTO prolongée dans le temps (variable selon les auteurs) • Morphologie du segment antérieur préservée et comparable à celle du GPAO 	<p><i>Garcia-Valenzuela et al, Exp eye Res 1995</i></p> <p><i>Park et al, J Ocul Pharmacol Ther 2008</i></p> <p><i>Yu et al, Exp eye Res 2008</i></p> <p><i>Nissirios et al, IOVS 2008</i></p> <p><i>Danias et al, exp eye Res 2006</i></p>

Nous avons donc choisi le modèle de glaucome induit par cautérisation des veines épisclérales car il présente de nombreuses similarités avec celui de l'homme : (i) la cautérisation des veines entraîne une élévation de la PIO stable et prolongée sur plusieurs mois ; (ii) il n'y a pas d'intervention directe sur le trabéculum et les structures intraoculaires ; (iii) l'anatomie du segment antérieure n'est pas modifiée, de façon similaire à ce qui est observé dans le GPAO humain ; (iv) l'anatomie oculaire du rat présente des structures antérieures plus proches de celles de l'œil humain que la souris. ; et (v) l'élévation induite de la PIO s'accompagne d'une dégénérescence progressive des cellules ganglionnaires rétiniennes, de façon identique à ce qui est observé chez l'homme atteint de GPAO.

1.4.2 Modèle par cautérisation des veines épisclérales

1.4.2.1 Procédure expérimentale

Le modèle expérimental d'HTO par cautérisation des veines épisclérales a été décrit pour la première fois par Garcia-Valenzuela *et al* en 1995. La procédure chirurgicale sous anesthésie générale et microscope opératoire consiste à réaliser une ouverture conjonctivale au limbe dans les cadrans supéro-temporal, supéro-nasal et inféro-nasal, suivie d'une dissection conjonctivo-sclérale avec repérage des muscles oculomoteurs. Les veines épisclérales –une veine par cadran en général- sont alors identifiées, isolées des plans profonds par dissection,

puis cautérisées par électrocoagulation bipolaire jusqu'à l'obtention d'un moignon turgescent signant un obstacle total au retour veineux.

Dans nos études, nous avons choisi de repérer en outre la totalité des veines épisclérales afin de contrôler la variabilité de vascularisation interindividuelle. Ainsi, si des veines épisclérales surnuméraires étaient repérées, elles étaient à leur tour cautérisées. Immédiatement après la procédure, un œdème cornéen transitoire lié à l'élévation brutale de la PIO était constaté, la cornée recouvrant sa transparence en trois jours environ. Afin de minimiser les biais expérimentaux, la procédure chirurgicale était répétée de la même façon dans l'œil contrôle controlatéral jusqu'à l'étape de dissection vasculaire, les veines n'étant alors pas cautérisées.

1.4.2.2 Phénotype du modèle

Pression intraoculaire. L'effet hypertonisant de la procédure à un mois est obtenu dans 80% des cas. Dans chaque série réalisée, la variabilité interindividuelle de l'HTO expérimentale - identifiée par l'écart-type- tend à se réduire puis se stabiliser dans le temps deux semaines après la procédure. Les rats ne présentant pas d'HTO significative ont été exclus à l'issue de cette période.

Segment antérieur. Peu de choses sont connues sur le segment antérieur des modèles expérimentaux d'HTO. Par imagerie ultrasonore à haute-fréquence *in vivo* (UBM), il a été montré que la cautérisation des veines épisclérales n'induisait pas de variation morphologique des différents éléments du segment antérieur -en particulier la profondeur de chambre antérieure, l'ouverture de l'angle irido-cornéen et la taille des corps ciliaires- contrairement à l'injection intraveineuse de sérum hypertonique (*Nisirios 2008*). Cette absence de modifications anatomiques est comparable à ce qui est observé chez l'homme en cas de GPAO.

L'étude histo-pathologique du segment antérieur n'a jamais été décrite quel que soit le modèle d'HTO expérimentale. Des résultats préliminaires de notre équipe semblent indiquer qu'il se produit un phénomène d'apoptose retardée des cellules trabéculaires, environ une semaine après la procédure chirurgicale, qui persiste ensuite de façon constante. Nos études de filtration trabéculaire *in vivo* confirment un ralentissement du turn-over aqueux lié à une augmentation de la résistance trabéculaire à l'écoulement sans modification de la synthèse de l'humeur aqueuse.

Dégénérescence neuro-rétinienne. De nombreuses études ont confirmé que l'HTO expérimentale obtenue par cautérisation des veines épisclérales induisait une atrophie neuro-rétinienne identique à celle retrouvée chez l'homme en cas de GPAO (*Guo 2005, Danias 2006, Urcola 2006, Wu 2007, Park 2008*). Ces études ont ainsi rapporté l'induction d'une apoptose des cellules ganglionnaires, un remodelage de la MEC et la synthèse de facteurs neurotrophiques et de médiateurs de l'inflammation. De façon comparable, nous avons observé une apoptose des cellules ganglionnaires en cas d'hypertonie induite. Néanmoins, l'étude de la dégénérescence ganglionnaire nécessiterait un suivi de plusieurs mois pour l'analyse de l'atrophie neuro-rétinienne secondaire.

2 PRINCIPE ET LIMITES THERAPEUTIQUES

L'objectif du traitement du glaucome est de maintenir la fonction visuelle et la qualité de vie des patients à un coût abordable (*European-Glaucoma-Society 2003*). Dans cette notion de coût interviennent les effets secondaires, les inconvénients liés aux traitements ainsi que et la composante financière pour l'individu et la société (*European-Glaucoma-Society 2003*).

Le seul traitement aujourd'hui disponible et cliniquement efficace pour prévenir le développement ou ralentir l'évolution d'un glaucome chez un patient présentant une HTO consiste à faire baisser la PIO (*European-Glaucoma-Society 2003*) afin d'obtenir une PIO dite « cible ». Cette PIO cible correspond à la PIO moyenne obtenue sous traitement permettant de ralentir la progression ou de prévenir l'apparition des déficits glaucomateux (*European-Glaucoma-Society 2003*). Le choix du traitement du glaucome ou de l'HTO est fait en fonction du patient, de son glaucome et des bénéfices et risques attendus de la thérapeutique choisie. L'arsenal thérapeutique pour diminuer la PIO comporte actuellement des traitements médicaux avec des collyres antiglaucomateux et des traitements chirurgicaux : le laser ou la chirurgie filtrante. Seuls les collyres antiglaucomateux hypotonisants seront envisagés dans cette thèse.

2.1 Mécanismes d'action des molécules hypotonisantes

2.1.1 Diminution de la production d'humeur aqueuse

β -bloquants. Les β -bloquants réduisent la PIO en diminuant la synthèse d'humeur aqueuse. (*Costa 2003; van der Valk. 2005*). Ils agissent en bloquant les récepteurs β_2 des cellules non

pigmentées de l'épithélium ciliaire des procès ciliaires et, par conséquent, inhibent la production d'humeur aqueuse qui a lieu normalement lors de la stimulation de ce récepteur (*Costa 2003*).

Inhibiteurs de l'anhydrase carbonique. Il existe actuellement deux inhibiteurs de l'anhydrase carbonique en collyre, le dorzolamide et le brinzolamide. L'anhydrase carbonique est une des enzymes majeures impliquées dans la formation d'humeur aqueuse (*Pfeiffer 1997*). Les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique agissent donc par diminution de la production d'humeur aqueuse. La réduction de la PIO obtenue après instillation de ces molécules est comprise entre 15 et 20% (*van der Valk 2005*).

Agonistes adrénergiques. Il existe des agonistes adrénergiques non sélectifs (épinéphrine et dipivéphrine) qui agissent sur les récepteurs α_1 , α_2 et β_2 adrénergiques, et des agonistes sélectifs des récepteurs α_2 (brimonidine et apraclonidine). Au niveau de l'œil, les récepteurs α_1 sont responsables de la vasoconstriction, de la mydriase, de la rétraction des paupières. Les récepteurs α_2 sont responsables de la baisse de la PIO en diminuant la sécrétion d'humeur aqueuse mais aussi en facilitant son élimination par la voie uvéosclérale et trabéculaire (*Potter 1990*). La baisse de la PIO obtenue après instillation d'agonistes adrénergiques est comprise entre 15 et 25%. (*European-Glaucoma-Society 2003; van der Valk 2005*).

2.1.2 Augmentation de la résorption d'humeur aqueuse

Voie uvéosclérale :analogues des prostaglandines et prostamides. Les analogues des prostaglandines (latanoprost, travoprost, tafluprost et unoprostone) et les prostamides (bimatoprost) diminuent la PIO en augmentant l'élimination uvéosclérale de l'humeur aqueuse (*Alexander 2002*). Leur mode d'action exact n'est pas encore totalement élucidé mais ils pourraient agir par induction de facteurs de transcription nucléaires et par une augmentation de la biosynthèse des MMP, provoquant une réduction de la MEC et l'élargissement des espaces interfibrillaires diminuant la résistance du muscle ciliaire, et par conséquent, entraînant l'augmentation de l'élimination uvéosclérale d'humeur aqueuse (*Weinreb 2002*). Les analogues des prostaglandines et les prostamides sont actuellement les molécules hypotonisantes les plus efficaces, avec une baisse de la PIO comprise entre 20 et 35% (*European-Glaucoma-Society 2003; van der Valk 2005*).

Voie trabéculaire :myotiques. Les agonistes cholinergiques (ou parasymphomimétiques) représentent la classe thérapeutique la plus ancienne dans le traitement du glaucome et de l'HTO. La principale molécule de cette classe thérapeutique est la pilocarpine qui agit par une

action directe sur la contraction du muscle longitudinal du corps ciliaire facilitant l'élimination de l'humeur aqueuse par la voie trabéculaire. La pilocarpine n'agit donc pas directement sur la trabéculopathie, mais elle ouvre anatomiquement l'angle irido-cornéen, offrant ainsi le maximum de surface filtrante au contact de l'humeur aqueuse. Elle est donc inefficace en cas de dysfonction trabéculaire importante. Son efficacité en terme de baisse pressionnelle est comprise entre 20 et 25% (*van der Valk 2005*).

2.2 Limite d'efficacité des traitements hypotonisants

L'extrême complexité d'interprétation des données concernant l'efficacité réelle des traitements hypotonisants actuels est liée à de multiples obstacles méthodologiques : (i) la nécessité d'analyser de très larges cohortes de patients sur une longue période, (ii) la diversité des séquences thérapeutiques mises en œuvre –pour l'initiation du traitement comme pour ses adaptations ultérieures-, (iii) les problèmes d'adhérence thérapeutique difficiles à évaluer qui grèvent l'efficacité thérapeutique réelle, et (iv) la variabilité des critères d'évaluation de la maladie selon les études.

Les grandes études cliniques prospectives et multicentriques nous ont cependant apporté les preuves de la nécessité de réduire l'HTO afin de diminuer le risque d'apparition ou de développement de la maladie glaucomateuse. Concernant les limites d'efficacité des traitements actuels, deux études -l'OHTS et l'EGPS- ont démontré un risque d'apparition de neuropathie glaucomateuse de 4,4% et 13,4% respectivement chez des patients traités pour une HTO isolée *versus* 9% et 14% chez les patients non traités. Au sujet des patients présentant initialement une neuropathie glaucomateuse associée à une HTO, l'EMGT et la CNTG ont démontré un risque de progression de la maladie de 45% et 20% respectivement chez les patients traités *versus* 60% chez les patients non traités.

Tout en apportant la preuve d'une nécessaire réduction de la PIO, ces études montrent aussi qu'une certaine proportion de patients échappe aux traitements médicaux actuels. En pratique clinique, nous sommes fréquemment amenés à prendre en charge des patients traités initialement stabilisés dont la neuropathie et l'HTO progressent à nouveau. Ces cas de figure conduisent à l'association progressive de deux, trois voire quatre traitements hypotonisants, puis à la réalisation d'un traitement par laser ou chirurgie, la pathologie échappant alors à tout traitement médical. Ce phénomène d'échappement pourrait trouver une explication dans le fait que les traitements actuels ne ciblent pas la trabéculopathie glaucomateuse initiale. Ainsi,

nous avons constaté que les trabéculum des patients ayant nécessité une chirurgie filtrante présentent une raréfaction extrême des cellules trabéculaires associée à un remaniement de la MEC, signant une altération anatomo-fonctionnelle majeure du trabéculum. La compréhension des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent cette trabéculopathie pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques visant directement les dysfonctions trabéculaires originelles.

2.3 Iatrogénicité des traitements

2.3.1 Notion de Surface oculaire

La surface oculaire est une entité morphofonctionnelle à part entière qui constitue l'interface entre le milieu extérieur et l'œil. La surface oculaire comprend les paupières, le film lacrymal et les glandes lacrymales, la conjonctive et la cornée. La surface oculaire assure deux principales fonctions :

- une **fonction de protection** mécanique, chimique et immunitaire, de par son organisation tissulaire, le maintien de son homéostasie, et ses capacités immunitaires.
- une **fonction visuelle** en assurant la transmission de la lumière vers les milieux internes.

La surface oculaire représente une étape de passage obligatoire pour tous les traitements locaux qui ciblent des structures plus internes comme l'humeur aqueuse, le trabéculum, les procès ciliaires, voire la choroïde. Ainsi, la surface oculaire, particulièrement la conjonctive, peut modifier l'effet thérapeutique des médicaments utilisés dans la maladie glaucomateuse. Réciproquement, les différents traitements antiglaucomateux administrés en topique peuvent modifier de façon importante et prolongée l'organisation cellulaire et la fonction de la conjonctive de par leur principe actif, leurs excipients, et en particuliers leurs conservateurs comme nous l'envisagerons plus loin.

2.3.1.1 Histologie de la conjonctive

La conjonctive est une membrane muqueuse spécifiquement impliquée dans les interactions entre la surface oculaire et les collyres antiglaucomateux. Elle sécrète le mucus essentiel à la stabilité du film lacrymal et à la transparence cornéenne. Très richement vascularisée et infiltrée de cellules immunocompétentes, elle joue un rôle immunitaire primordial.

Epithélium. L'épithélium conjonctival est de type pluristratifié composé de 2 à 8-10 couches de cellules selon la localisation. Comme dans toutes les muqueuses, l'épithélium comporte des cellules en position basale, elles sont cubiques à noyau ovale réparties sur une seule couche reposant sur une membrane basale, et des cellules superficielles de formes variables en fonction de la localisation au sein de la conjonctive. Les cellules superficielles présentent des microvillosités de surface mais celles-ci sont moins importantes comparées aux cellules cornéennes superficielles. Dans les zones où l'épithélium conjonctival est plus épais, au limbe et au fornix par exemple, il existe également des cellules intermédiaires dont le nombre de couches varie. Notre équipe a largement démontré que les cellules épithéliales étaient directement impliquées dans de nombreuses réactions biologiques, particulièrement dans les processus inflammatoires et apoptotiques (*Brignole 1998; Baudouin 2001; Brignole-Baudouin 2004*). L'épithélium conjonctival contient 1 à 2 millions de cellules à mucus – ou mucocytes, ou cellules caliciformes- réparties de façon inégale sur la conjonctive, la plus forte densité se rencontrant au niveau des parties bulbaires et nasales. Ces cellules jouent un rôle particulièrement important dans les pathologies de la surface oculaire et la perte de ces cellules est considérée par de nombreux auteurs comme un indicateur sensible mais peu spécifique de troubles chroniques de la surface oculaire (*Kinoshita 1983; Nelson 1984*).

Stroma. Le stroma conjonctival est situé sous l'épithélium et en est séparé par la lame basale. Sa couche superficielle est une trame conjonctive fine et infiltrée de nombreux éléments cellulaires, essentiellement des lymphocytes, des monocytes et des mastocytes. La couche profonde fibreuse est formée de trousseaux denses de fibres collagènes entremêlées de fibres élastiques. L'infiltration de cellules immunitaires associée à la richesse du réseau vasculaire conjonctival – par opposition à la cornée- explique la rapidité de déclenchement et l'importance des réactions inflammatoires qui s'y déroulent.

2.3.1.2 Immunologie de la surface oculaire

La conjonctive est à la fois un tissu de revêtement exerçant un rôle de protection mécanique et une véritable barrière défensive, remplie de cellules immunitaires, prêtes à capter puis à détruire l'agresseur. Ces défenses immunitaires s'exercent à la fois au niveau de l'épithélium et du stroma.

Défense conjonctivale. Sur le plan immunologique, l'épithélium conjonctival possède un

réseau dense de cellules immunitaires intraépithéliales présentatrices d'antigènes:les cellules de Langerhans ou cellules dendritiques (Figure 4). La densité de celles-ci est estimée à 250 à 300 par mm² chez l'homme au niveau de la conjonctive limbique (*Bora 1993*). Ces cellules émettent des prolongements fins et multiples, et se déplacent entre les cellules épithéliales en fonction de l'état inflammatoire local. En cas d'inflammation de surface, leur densité augmente considérablement et une importante migration vers la superficie conjonctivale peut être observée. Il n'y a que peu d'études sur l'immunophénotypage des cellules dendritiques oculaires humaines (*Baudouin 1997*). Les cellules de Langerhans expriment à leur surface des antigènes de classe II du CMH et l'antigène CD1a de façon constitutive, ce qui les rend potentiellement actives immunologiquement (*Philipp 1991; Baudouin 1997*).

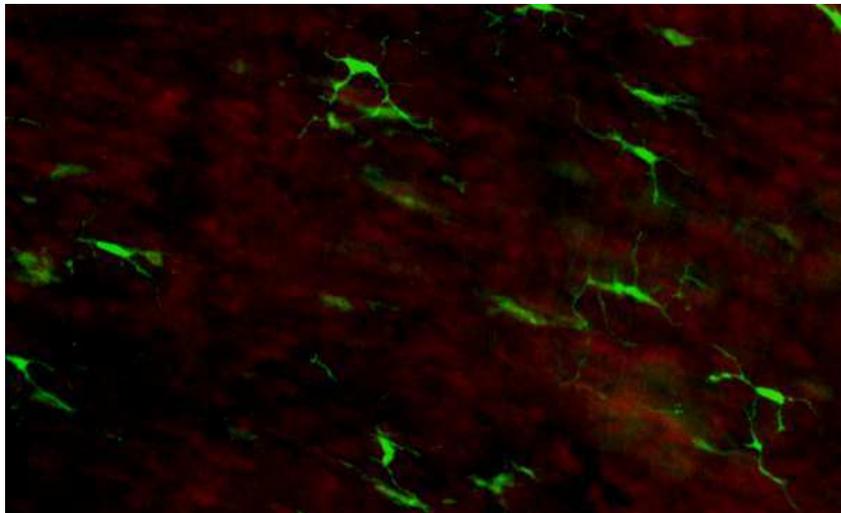


Figure 4: Cellules dendritiques au sein de la conjonctive d'une souris transgénique CX3CR1^{gfp/gfp}). Fluorescence verte du cytoplasme des cellules dendritiques, coloration des noyaux des cellules épithéliales conjonctivales à l'iodure de propidium (rouge). Microscopie confocale, ×200.

L'épithélium conjonctival contient aussi des lymphocytes intraépithéliaux, essentiellement en position basale. Il s'agit surtout de lymphocytes de type T, majoritairement CD3+/CD8+ (rapport CD4/CD8 d'environ 0,3), à l'inverse de la répartition lymphocytaire du stroma sous-épithélial (*Hingorani 1997*). L'épithélium conjonctival joue un rôle dans le système de défense immunologique de la surface oculaire. En effet, en cas d'inflammation, les cellules épithéliales surexpriment ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1), molécule d'adhésion qui en se liant au LFA-1 des lymphocytes et des cellules phagocytaires permet leur migration à travers l'épithélium (*Abu el-Asrar 1996; Gill 1997*). L'interféron γ (IFN γ) semble induire cette expression d'ICAM-1 en cas d'inflammation locale (*Bouchard 1996*). Les cellules épithéliales, également sous l'effet de l'IFN γ , expriment les antigènes de classe II HLA-DR

(Human leukocyte antigen-DR), qui leur confèrent des propriétés d'immunocompétence propre. L'expression de ces marqueurs peut être analysée et quantifiée sur des biopsies ou des empreintes conjonctivales, et constitue un test diagnostique d'inflammation (*Baudouin 1997*). Cette expression est ainsi retrouvée chez les patients glaucomateux multitraités. Les cellules épithéliales synthétisent également des cytokines qui jouent probablement un rôle d'amplification des réactions inflammatoires locales. L'IL-1 (Interleukine-1), IL-6 ou l'IL-8 sont présentes à l'état normal dans les cellules épithéliales. Leur synthèse est également augmentée chez les patients glaucomateux traités au long cours (*Baudouin 2004*).

Privilège immunitaire cornéen. Contrairement à la conjonctive, la cornée n'est paradoxalement que très peu défendue par le système immunitaire. Si les structures du limbe contiennent un contingent de cellules de Langerhans en connexion avec les cellules immunitaires du stroma conjonctival, les cellules dendritiques représentent les seules cellules immunocompétentes de la cornée, où elles sont visibles dans les couches basales de l'épithélium périphérique (*Klareskog 1979; Pels 1984*). Notons enfin que le caractère avasculaire spécifique de la cornée préserve celle-ci de toute migration immunitaire.

2.3.2 Inflammation de la surface oculaire liée aux conservateurs

2.3.2.1 Conservateurs

Les conservateurs sont un des composants majeurs des collyres, utilisés pour préserver la stérilité mais aussi parfois pour stabiliser le composant actif dans les flacons de collyres multidoses. Sans conservateur, le contenu d'un flacon multidose utilisé deux fois par jour est habituellement contaminé en 1 à 2 semaines (*Schein 1992*). Il existe un grand nombre de conservateurs utilisés en association avec un ou plusieurs principes actifs dans les collyres. On les distingue habituellement par leur mode d'action: chimique, antioxydant ou complexant afin de renforcer l'action d'autres conservateurs.

Chlorure de benzalkonium. Nos études concernent le BAC, conservateur principal qui entre dans la composition de la quasi-totalité des collyres antiglaucomateux, à une concentration variant de 0,004 à 0,02 %. C'est un mélange d'ammoniums quaternaires benzylés et diméthylés. De par sa structure, ce conservateur est un composé bipolaire, très hydrosoluble, ayant des propriétés tensioactives. Sa chaîne carbonée est longue et peut varier de C8 à C18. Son pouvoir bactéricide rapide est augmenté en milieu alcalin à 37°C. Cette action est liée aux

propriétés électrostatiques de la molécule qui peut pénétrer à l'intérieur de la membrane de la bactérie, entraînant ainsi sa destruction. Ces propriétés bactéricides escomptées sont en contrepartie associées à des effets cytotoxiques délétères au niveau de la surface oculaire (*Gasset 1974; Burstein 1980; Tripathi 1992*). Le BAC possède également des propriétés surfactantes, par lesquelles il dissout la phase lipidique du film lacrymal. L'effet dessiccateur et cytotoxique des ammoniums quaternaires est lié à la destruction du noyau ou de la chaîne latérale des dérivés méthylés qui libère une mono- ou une diméthylamine. Parfaitement connue depuis longtemps, la cytotoxicité du BAC a été utilisée au départ pour améliorer la pénétration du principe actif dans la chambre antérieure. Les études de plus en plus nombreuses comparant l'efficacité des collyres antiglaucomateux en fonction de la présence ou non d'un conservateur ont néanmoins conclu à l'absence de différence significative.

2.3.2.2 Toxicité du chlorure de benzalkonium

Toxicité clinique. Les effets secondaires des traitements antiglaucomateux et de leurs conservateurs dépendent essentiellement de la durée du traitement, du nombre d'instillation, et de l'état initial de la surface oculaire. Ils vont de l'inconfort oculaire jusqu'à des atteintes possiblement cécitantes de la surface oculaire. Le rôle majeur du BAC dans la genèse des effets secondaires observés au niveau de la surface oculaire des patients glaucomateux a été largement démontré (**Tableau 2**) que ce soit au niveau du film lacrymal, de la cornée ou encore de la conjonctive (*Levrat 1998; Pisella 2002; Asbell 2005; Baudouin 2008*).

Dans une étude portant sur plus de 9600 patients, plus de 40% des patients traités pour un glaucome ou une HTO présentaient des symptômes d'atteintes de la surface oculaire comme des douleurs ou un inconfort à l'instillation, des sensations de corps étranger, des brûlures ou démangeaisons, des sensations d'œil sec, et plus de 20% des signes cliniques à type de blépharites, d'hyperhémies conjonctivales ou de kératites (*Jaenen 2007*). L'ensemble de ces signes était significativement plus fréquent chez les patients exposés aux conservateurs. Plus récemment, *Leung et al.*, ont analysé 101 patients atteints de glaucome chronique à angle ouvert ou d'HTO (*Leung 2008*). Plus de la moitié des patients ont rapporté des symptômes dans un œil au moins, avec une atteinte sévère chez 27% d'entre eux. La fréquence des lésions de la surface oculaire doublait en cas de traitement avec conservateur. Les symptômes des maladies de la surface oculaire peuvent être très gênants et parfois sévères, affectant la qualité de vie des patients mais aussi leur capacité à travailler (*Miljanovic 2007*). Ils ont également un effet direct sur l'efficacité des traitements antiglaucomateux car ils diminuent l'observance et l'adhérence thérapeutiques. Après l'oubli et les erreurs d'administration, les

effets secondaires liés au traitement du glaucome seraient la troisième cause de mauvaise observance (*Chawla 2007*).

Tableau 2 : Principales publications évaluant les effets des traitements antiglaucomateux sur la surface oculaire.

	Film lacrymal	Conjonctive	Cornée
Etudes expérimentales sur l'animal	Wilson et al, Br J Ophthalmol 1975 Pisella et al, Ophthalmic Res 2000 Pisella et al, Br J Ophthalmol 2002	Young et al, Ophthalmology 1990 Mietz et al, Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1994 Mietz et al, Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1997 Becquet et al, Curr Eye Res 1998 Baudouin et al, Ophthalmology 1999 Noecker et al, Cornea 2004 Ito et al, Invest Ophthalmol Vis Sci 2006 Liang et al, Br J Ophthalmol 2008 Kahook et al, Cornea 2008	Burstein, Surv Ophthalmol 1980 Dormans et al, Toxicol Appl Pharmacol 1982 Lopez Bernal et al, Curr Eye Res 1991 Ichijima et al, Cornea 1992 Imayasu et al, CLAO J 1992 Becquet et al, Curr Eye Res 1998 Baudouin et al, Ophthalmology 1999 Furrer et al, Eur J Pharmacol Biopharm 1999 Furrer et al, J Fr Ophthalmol 2001 Noecker et al, Cornea 2004 Liang et al, Br J Ophthalmol 2008 Kahook et al, Cornea 2008
Cultures cellulaires humaines (in vitro)		Takahashi et al, Jpn J Ophthalmol 1982 De Saint Jean et al, Invest Ophthalmol Vis Sci 1999 De Saint Jean et al, Exp Eye Res 2004 Debbasch et al, Invest Ophthalmol Vis Sci 2001 Debbasch et al, Invest Ophthalmol Vis Sci 2001 Pisella et al, Invest Ophthalmol Vis Sci 2004 Guenoun et al, Invest Ophthalmol Vis Sci 2005 Guenoun et al, Invest Ophthalmol Vis Sci 2005 Brasnu et al, Curr Eye Res 2005	Samples et al, Exp Eye Res 1989 Saarinen-Savolainen et al, Pharm Res 1998 Ito et al, Invest Ophthalmol Vis Sci 2006 Yee et al, Adv Ther 2006 Pauly et al, Invest Ophthalmol Vis Sci 2009
Cellules humaines (ex vivo)		Scherwood et al, Ophthalmology 1989 Broadway et al, Arch Ophthalmol 1994 Baudouin, Curr Opin Ophthalmol 1996 Baudouin et al, Ophthalmology 1994 Baudouin et al, Ophthalmology 1999 Baudouin et al, Ophthalmology 2004 Pisella et al, Invest Ophthalmol Vis Sci 2004 Aritürk et al, Int Ophthalmol 1996 Nuzzi et al, Int Ophthalmol 1998 Albietz et al, Curr Eye Res 2001 Dogan et al, Clin Experiment Ophthalmol 2004 Hong et al, Am J Ophthalmol 2006	

Etudes cliniques	Wilson et al, Br J Ophthalmol 1975 Herreras et al, Ophthalmology 1992 Kuppens et al, Br J Ophthalmol 1995 Yalvaç et al, Acta Ophthalmol Scand 1995 Nuzzi et al, Int Ophthalmol 1998 Baudouin et al, Br J Ophthalmol 1998 Arici et al, Clin Experiment Ophthalmol 2000 Kozobolis et al, Am J Ophthalmol 2005 Manni et al, Am J Ophthalmol 2005 Leung et al, J Glaucoma 2008	Schwab et al, Ophthalmology 1992 Herreras et al, Ophthalmology 1992 Levrat et al, J Fr Ophthalmol 1999 Turacli et al, Int Ophthalmol 1997 Arici et al, Clin Experiment Ophthalmol 2000 Albietz et al, Curr Eye Res 2001 Pisella et al, Br J Ophthalmol 2002 Jaenen et al, Eur J Ophthalmol 2007 Leung et al, J Glaucoma 2008	Lemp et al, Am J Ophthalmol 1988 Herreras et al, Ophthalmology 1992 de Jong et al, Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1994 Levrat et al, J Fr Ophthalmol 1999 Eleftheriadis et al, Br J Ophthalmol 2002 Kozobolis et al, Am J Ophthalmol 2005 Jaenen et al, Eur J Ophthalmol 2007 Leung et al, J Glaucoma 2008
-------------------------	---	--	---

Toxicité *ex vivo*. Quelques études ont évalué les effets des traitements du glaucome sur la conjonctive à partir de biopsies réalisées au moment de la chirurgie du glaucome. Certains retrouvaient une infiltration lymphocytaire et macrophagique accrue chez les patients multitraités au long cours (*Broadway 1994*). *Sherwood et al* ont observé une augmentation de la densité en macrophages, mastocytes, lymphocytes intra et sous-épithéliaux, et de fibroblastes dans la conjonctive (*Sherwood 1989*). L'intensité de cette réponse inflammatoire serait proportionnelle au nombre et à la durée d'utilisation de collyres antiglaucomateux (*Ariturk 1996*). *Baudouin et al.* ont comparé la conjonctive mais aussi le trabéculum de patients traités au long cours par rapport à des sujets normaux. Parmi les patients multitraités, 92% des prélèvements conjonctivaux et 87% des prélèvements trabéculaires montraient une infiltration de cellules inflammatoires et fibroblastiques. Parmi les patients sous monothérapie, 63% des prélèvements conjonctivaux et 40% des trabéculums étaient pathologiques (*Baudouin 1999*).

Moins invasive que la biopsie conjonctivale, la technique des empreintes conjonctivales en cytologie classique a aussi permis d'évaluer les effets conjonctivaux des traitements antiglaucomateux sur la conjonctive, rapportant une métaplasie conjonctivale accrue associée à une raréfaction des cellules à mucus chez les patients traités au long cours par des collyres conservés (*Brandt 1991; Herreras 1992; Yalvac 1995; Turacli 1997; Arici 2000*). Aucune différence n'a néanmoins été observée entre les différents traitements dans la plupart de ces études. Le petit nombre de patients dans chaque groupe (20 à 40 le plus souvent) et la durée relativement faible du suivi pourraient expliquer ce manque de significativité (*Asbel 2005*).

L'exploitation classique des EC en cytologie étant limitée, de nouvelles procédures comme

l'immunohistochimie et surtout la cytométrie en flux, notamment développées et validées par notre équipe, ont permis de mieux explorer les mécanismes de la réponse cellulaire et tissulaire aux collyres antiglaucomateux. Grâce à nos travaux, l'expression de HLA-DR sur les cellules conjonctivales est aujourd'hui considérée comme un des marqueurs majeurs de l'inflammation épithéliale (*Cvenkel2002; Guglielminetti 2002; Bensoussan 2003; Pisella 2004; Brignole-Baudouin 2004*). La surexpression d'autres marqueurs inflammatoires comme ICAM-1 (*Pisella 2004*) ou les interleukines 6 et 8 (IL-6 et IL-8) (*Bensoussan 2003*) ont aussi été observées chez les patients glaucomateux traités, mais aussi une diminution de l'expression de MUC5AC (*Pisella 2004*) reflétant l'activité des cellules à mucus, une augmentation de la production de radicaux libres (*Debbasch 2000*), ou encore une surexpression des récepteurs aux chimiokines CCR4 et CCR5 (*Baudouin 2005; Baudouin 2008*). Enfin, Dogan *et al.* ont observé des taux d'apoptose plus importants au niveau de l'épithélium conjonctival de patients traités pour un glaucome par rapport à des sujets non traités (*Dogan 2004*).

2.3.3 Modèles expérimentaux de toxicité

2.3.3.1 Modèles animaux

Les effets du BAC sur la surface oculaire sont connus depuis de très nombreuses années, en partie grâce aux études chez l'animal qui ont très tôt démontré leur toxicité. A 0,005 %, le BAC entraîne une toxicité directe pour les cellules superficielles, avec des érosions épithéliales (*Burstein 1980*). Wilson *et al.*, ont démontré dès 1975 que le BAC 0,01 % altérait le film lacrymal précornéen chez les lapins (*Wilson 1975*). A des concentrations plus fortes encore (1 à 2 %), le benzalkonium détruit totalement le segment antérieur en moins d'une semaine (*Gasset 1974*). Plus récemment, Pisella *et al.* ont confirmé ces résultats en montrant une diminution du temps de rupture du film lacrymal (BUT) chez des lapins traités avec du timolol conservé (BAC 0,01%) par rapport aux animaux instillés avec du timolol non conservé (*Pisella 2000*). Sur un modèle de lapin, Furrer *et al.* ont montré des atteintes cornéennes liées à l'utilisation de β -bloquants conservés et de benzododécinium bromide 0,012% (*Furrer 2001*). D'autres publications ont également montré que les conservateurs étaient reliés au développement d'une fibrose chronique de la conjonctive (*Mietz. 1997*). Noecker *et al.* ont montré sur des lapins que les traitements contenant les plus fortes

concentrations de BAC résultaient en des atteintes plus importantes de la cornée et de la conjonctive comparées aux traitements contenant moins de BAC (Noecker 2004). L'administration chez le rat de solutions de BAC à 0,01% a été associée à l'infiltration de cellules immunocompétentes au niveau du limbe et de la conjonctive bulbaire (Becquet 1998). Baudouin *et al.* ont observé plusieurs aspects de la toxicité des traitements locaux du glaucome chez le rat qui présentait des altérations des épithélia cornéen et conjonctival associées à une infiltration conjonctivale de cellules inflammatoires en cas de traitement conservé par BAC (Baudouin 1999). Plus récemment, Liang *et al.* ont analysé la cornée et la conjonctive de lapins traités avec du latanoprost (Xalatan®), du tafluprost sans conservateur et du BAC (0,02%). Cette étude réalisée en microscopie confocale *in vivo* et à l'aide d'empreintes conjonctivales *ex vivo* a montré des signes locaux de toxicité plus importants chez les lapins traités avec du latanoprost conservé et du BAC, par rapport aux lapins traités avec le tafluprost non conservé et les lapins témoins qui présentaient une surface oculaire quasi normale (Liang 2008). Ces résultats ont été confirmés par Kahook *et al.* (Kahook 2008).

2.3.3.2 Modèles *in vitro*

De très nombreuses études ont démontré *in vitro* les effets du BAC sur des cellules conjonctivales et cornéennes d'origine humaine. Sur des cellules cornéennes, le BAC à une concentration de 0,002% inhibe la croissance cellulaire *in vitro* (Samples 1989). A la concentration de 0,007 %, le temps nécessaire pour entraîner la lyse de 50 % de cellules d'une culture d'épithélium conjonctival n'est que de 90 à 100 secondes (Takahashi 1982). Sur des cellules conjonctivales de type Wong-Kilbourne dérivée de la conjonctive de Chang (WKC), l'exposition à du BAC 0,1% et 0,05% entraîne une lyse cellulaire immédiate. Une exposition à une concentration de 0,01% est associée à une mort cellulaire par apoptose dans les 24 heures, et des concentrations aussi faibles que 0,005 et 0,0001% induisaient une apoptose dans les 24-72 heures d'une manière dose-dépendante (De Saint Jean 1999). Pisella *et al.* ont également observé sur le même type de cellules que le latanoprost (avec BAC 0,02%) et le timolol (avec BAC 0,02%) étaient associés à des effets pro-apoptotiques (Pisella 2004). Récemment, ces résultats ont été confirmés sur un modèle tissulaire de cornée *in vitro* traitée avec du BAC, montrant une réponse toxique au BAC dose-dépendante et une surexpression de marqueurs d'apoptose (caspase-3), inflammatoires (ICAM-1) et de prolifération cellulaire (Ki67) liés à ce conservateur (Pauly 2009).

3 SYSTEMES CHIMIOKINES/RECEPTEURS

3.1 Description

3.1.1 Chimiokines

Les chimiokines –contraction de « chemoattractant cytokines »- sont des protéines de faibles poids moléculaire constituées de 60 à 80 acides aminés. Une cinquantaine de chimiokines a été identifiée à ce jour. Cette famille de protéines est caractérisée par une homologie de séquence en acides aminés variant de 20% à 80%, ainsi qu'un motif commun incluant deux ou quatre cystéines conservées. Les chimiokines sont ainsi répertoriées structurellement selon le nombre d'acides aminés qui séparent les deux premières cystéines situées en N-terminal et constituent quatre grandes familles : C-, CC-, CXC- et CX3C- (**Tableau 3**).

Les premières chimiokines ont été initialement identifiées il y a une vingtaine d'années et décrites pour leur forte inductibilité d'expression dans des conditions inflammatoires et leur capacité d'attraction et d'activation de certaines populations leucocytaires vers les sites de l'inflammation (*Wolpe 1989, Ransohoff 1998, Rossi 2000, Proudfoot 2002*). Leur implication dans le système immunitaire ne se cantonne cependant pas à la migration cellulaire dans des conditions pathologiques inflammatoires. En 1996, la découverte que certains récepteurs des chimiokines représentaient des corécepteurs de l'infection au VIH-1, notamment CXCR4 et CCR5, a accéléré l'étude des différents systèmes chimiokine/récepteurs. Les chimiokines interviennent aussi dans la régulation physiologique de l'ensemble du trafic leucocytaire dans les organes et vaisseaux lymphoïdes, ainsi que dans la maturation, la différenciation et l'activation de différentes lignées de cellules de l'immunité (*Moser 2004, Ebert 2005, Lapidot 2005, Schaerli 2005*). Plus récemment, il a été démontré que les chimiokines jouaient un rôle déterminant dans des phénomènes non-immuns -physiologiques ou pathologiques- comme le développement embryologique et la neuromodulation au sein du SNC (*Rostène 2007, Rostène 2011*) , l'angiogénèse, le trafic et le homing des cellules souches mésenchymateuses, ou encore la croissance et la migration tumorale (**Figure 5**) (*Rollins 1997, Luster 1998, Rossi 2000, Strieter 2005*).

Tableau 3 : Classification structurale des chimiokines. Nos travaux se sont portés sur les chimiokines CXCL12 (SDF-1), CX3CL1 (Fractalkine) et leurs récepteurs.

Famille	Dénomination officielle	Dénomination commune	Famille	Dénomination officielle	Dénomination commune	
C-	CL1	Lymphotactin α	CC-	CCL1	I-309	
	CL2	Lymphotactin β		CCL2	MCP-1	
CXC-	CXCL1	GRO α		CCL3	MIP-1 α	
	CXCL2	GRO β		CCL4	MIP-1 β	
	CXCL3	GRO γ		CCL5	RANTES	
	CXCL4	PF-4		CCL6	C10	
	CXCL5	ENA-78		CCL7	MCP-3	
	CXCL6	GCP-2		CCL8	MCP-2	
	CXCL7	NAP-2		CCL9	MIP-1 γ	
	CXCL8	IL-8		CCL10	<i>nd</i>	
	CXCL9	MIG		CCL11	Eotaxin	
	CXCL10	IP-10		CCL12	MCP-5	
	CXCL11	I-TAC		CCL13	MCP-4	
	<u>CXCL12</u>	<u>SDF-1</u>			CCL14	CC-1
	CXCL13	BCA-1			CCL15	Leukotactin-1
	CXCL14	BRAK			CCL16	LEC
	CXCL15	Lungkine			CCL17	TARC
	CXCL16	<i>nd</i>			CCL18	PARC
CX3C-	<u>CX3CL1</u>	<u>Fractalkine</u>		CCL19	ELC	
				CCL20	LARC	
				CCL21	SLC	
				CCL22	MDC	
				CCL23	MPIF-1	
				CCL24	MPIF-2	
			CCL25	TECK		
			CCL26	Eotaxin-3		
			CCL27	Eskine		
			CCL28	MEC		

Historiquement, il existe une distinction entre (i) les chimiokines « de l'inflammation » – comme CX3CL1 - dont la synthèse inductible est préférentiellement stimulée au cours de processus inflammatoires pathologiques, et (ii) les chimiokines « de l'homéostasie » – comme CXCL12 – qui sont exprimées à l'état basal et participent essentiellement au maintien d'équilibres physiologiques. Ainsi, la majorité des chimiokines dites de l'inflammation ne sont pas indispensables au fonctionnement physiologique de l'organisme, alors que l'absence d'expression d'une ou plusieurs chimiokines de l'homéostasie engendre un phénotype létal. La connaissance croissante des phénomènes impliquant les chimiokines montre aujourd'hui que la dichotomie inflammation/homéostasie est impropre.

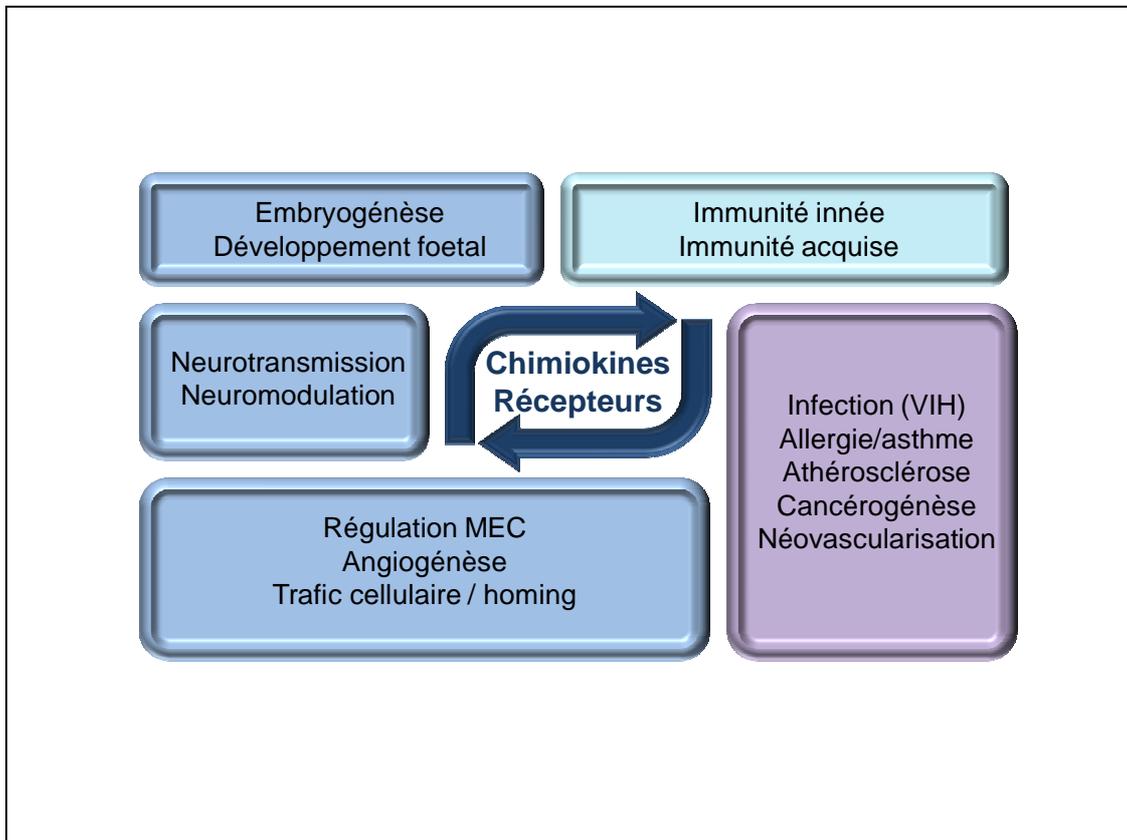


Figure 5: Représentation schématique de l'implication des systèmes chimiokinergiques dans les processus physiologiques et pathologiques.

3.1.2 Récepteurs des chimiokines

3.1.2.1 Structure

Toutes les chimiokines exercent leurs fonctions par l'intermédiaire de GPCRs constitués de 340 à 370 acides aminés (*Horuk 2001*). Une vingtaine de récepteurs a été identifiée et répertoriée selon la même nomenclature que celle retenue pour leurs ligands (**Figure 6**). Ces GPCRs présentent une homologie de structure primaire variant de 25% à 80% et caractérisée par :

- *Une brève séquence N-terminale,*
- *Sept domaines transmembranaires,*
- *Un résidu cystéine pour chacun des quatre domaines extracellulaires,*
- *Une séquence conservée de 9 acides aminés dans le second domaine intracellulaire couplée aux protéines G,*
- *Plusieurs résidus sérine et thréonine en C-terminal qui sont phosphorylés en cas d'activation.*

3.1.2.2 Redondance des interactions ligands/récepteurs

La redondance des interactions ligands/récepteurs caractérise les chimiokines. Elle est définie par le fait qu'une chimiokine peut être le ligand de plusieurs récepteurs, à des degrés d'affinité variables, et que plusieurs récepteurs peuvent partager le même ligand ou agoniste (**Figure 6**). Cette redondance importante a pour conséquence directe de stabiliser l'ensemble des systèmes, tout en compliquant l'étude des conséquences de ces interactions multiples. Elle entretient ainsi la robustesse et l'adaptabilité de la réponse inflammatoire et immune qui obéit ainsi à un réseau protéique et non à un unique élément. Nous pouvons cependant remarquer que certains systèmes de chimiokines dérogent à la cette règle, à l'instar de CX3CL1/CX3CR1.

D'autres voies de signalisation conduisant à l'activation de facteurs de transcription comme JAK/STAT et la voie du NF- κ B sont classiquement activées par les GPCRs. Les MAP kinases JNK et p38 peuvent aussi entrer en jeu. Notons enfin que certaines interactions chimiokine-récepteur peuvent activer les voies de Rho, Ras, ou bien encore celle des caspases. (Meucci 2000, Mellado 1998, Mueller 2004).

Enfin, certains récepteurs aux chimiokines peuvent s'homo- ou s'hétéro-dimériser, comme cela a été démontré pour CXCR4 (*cf infra*), ou bien s'oligomériser avec des récepteurs d'autres familles. Cependant, cet élément complexe de régulation de la réponse cellulaire aux chimiokines demeure encore mal connu.

3.1.3 Antagonistes non-peptidiques des récepteurs des chimiokines

La caractérisation biochimique des GPCRs, l'étude des liaisons chimiokines/récepteurs et l'analyse des voies de signalisation ont permis le développement d'antagonistes non-peptidiques caractérisés par leur forte affinité pour certains GPCRs et leur pouvoir bloquant. L'étude pharmacodynamique de la spécificité et de l'efficacité d'un antagoniste d'un GPCR repose sur : (i) sa capacité de compétition de liaison avec un ligand connu, évaluée *in vitro* grâce à des protéines radiomarquées ; (ii) sa capacité d'inhiber les voies de signalisation déclenchées par l'interaction chimiokine/récepteur qui peut être évaluée par imagerie calcique par exemple; (iii) sa capacité à inhiber le chimiotactisme spécifique de cette interaction dans des essais de migration cellulaire *in vitro*.

Encouragé par des enjeux thérapeutiques majeurs comme l'infection à VIH ou les pathologies auto-immunes, certains antagonistes non-peptidiques sont parvenus jusqu'aux essais cliniques de phase III, le plus abouti étant le UK-427,857 (maraviroc, Pfizer) antagoniste spécifique de CCR5 qui inhiberait la fusion lymphocytaire du VIH-1. Antagoniste spécifique de CXCR4, l'AMD 3100 que nous utilisons dans notre étude a été testé dans l'infection à VIH-1 (Donzela 1998), la prolifération et la migration de certaines cellules cancéreuses (Bertolini 2002), ou la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques (Cashen 2008). Le principal handicap de tels antagonistes réside dans les effets secondaires généraux liés à l'inhibition systémique massive d'interactions chimiokine/récepteur indispensables au maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire de l'organisme. On peut dès lors remarquer que l'administration

ophtalmologique par voie locale permettrait de s'affranchir de ces effets systémiques qui ont aujourd'hui fait échouer tout essai de développement thérapeutique à grande échelle.

Enfin certains antagonistes ont été utilisés sans succès dans des pathologies dysimmunes (*Pease 2005*). C'est le cas des antagonistes de CCR1 -CP-481,515 (Pfizer) dans la polyarthrite rhumatoïde et BX471 (Schering) dans la sclérose multiple-, et du T487 (Amgen) antagoniste de CXCR3 testé en phase II sans succès contre le psoriasis. Plus récemment, d'autres antagonistes de CXCR3 ont été développés et testés, comme l'AMG487, le VUF5834, le VUF10132 et le NBI74330 que nous utilisons dans notre étude. Le NBI74330 est un antagoniste puissant d'affinité comparable pour le CXCR3 humain et le CXCR3 murin (*Heise 2005*). L'analyse de ses caractéristiques pharmacodynamique a montré qu'il agisse comme un antagoniste spécifique non-compétitif avec effet agoniste inverse en cas d'activation permanente du récepteur (*Verzjl 2008*). *In vivo*, un antagoniste de CXCR3 a permis d'inhiber la prolifération et la dissémination de cellules cancéreuses pulmonaires (*Walser 2006*).

3.2 CXCL12 et ses récepteurs

3.2.1 Chimiokine CXCL12

CXCL12 a été initialement cloné en 1993 à partir du stroma de tissu hématopoïétique murin et ainsi nommé SDF-1 pour « stromal cell derived factor-1 » (*Tashiro 1993*). CXCL12 appartient à la famille des chimiokines en CXC-. Chez l'homme, le gène codant pour CXCL12 est situé sur le chromosome 10 alors que les autres chimiokines de cette famille sont portées par le chromosome 4 (*Shirozu 1995*). CXCL12 existe sous deux isoformes humaines, SDF-1 α et SDF-1 β , qui sont le produit d'un épissage alternatif. Récemment, quatre autres isoformes ont été identifiées selon le nombre d'acides aminés C-terminaux supplémentaires :SDF-1 γ , SDF-1 δ , SDF-1 ϵ et SDF-1 ϕ (*Yu 2006*). Toutes ces isoformes sont fonctionnelles et présentent la même affinité pour le récepteur CXCR4. La structure de CXCL12 est très conservée entre les espèces et présente plus de 95% d'homologie de séquence chez l'homme, le félin, la souris et le rat (*Pillarsetti 2001*).

CXCL12 est une chimiokine fortement basique de 89 acides aminés dont 21 pour le peptide signal. Sa structure tridimensionnelle déterminée par RMN comporte trois feuillet β

antiparallèles et une hélice α (Crump 1997). Les huit premiers acides aminés N-terminaux ainsi que les acides aminés 12 à 17 constituent le site de liaison à son récepteur CXCR4. Les deux premiers acides aminés N-terminaux sont indispensables à son activité biologique médiée par CXCR4. Chez l'homme, CXCL12 est synthétisée de façon constitutive par les CSH, les fibroblastes et cellules dérivées, les neurones et les astrocytes, et certaines cellules dérivées des monocytes.

Il a été démontré *in vivo* que CXCL12 pouvait se dimériser et se lier aux héparanes sulfates de la MEC (Dealwis 1998) par l'intermédiaire des deux premiers feuilletts β ainsi que par interaction de charges. Cette organisation permettrait d'une part d'augmenter l'activité de la chimiokine en concentrant celle-ci au niveau de sites spécifiques (Amara 1999), et de protéger d'autre part sa structure de la dégradation protéolytique (Sadir 2004).

3.2.2 Récepteurs de CXCL12

3.2.2.1 CXCR4

La chimiokine CXCL12 exerce son activité *via* son récepteur CXCR4. CXCR4 a été cloné pour la première fois en 1991 à partir de l'ADN complémentaire du locus coeruleus d'un cerveau de bœuf et ainsi initialement nommé LCR-1 (Rimland 1991). En 1997, CXCR4 a été identifié pour la première fois comme un des corécepteurs participant à la fusion – d'où une appellation « LESTR/fusin » parfois retrouvée dans la littérature – et à l'entrée du VIH dans les lymphocytes CD4⁺ (Doranz 1997).

CXCR4 est un GPCR codé par un gène porté par le chromosome 2. Sa séquence de 352 acides aminés constitue une protéine de 39,7 kDa à sept domaines transmembranaires. Tout comme pour son ligand, une homologie de séquence d'environ 90% a été retrouvée entre la protéine de l'homme et celle du rat. Notons enfin qu'il existe un second transcrit minoritaire, CXCR4-Lo, produit par épissage alternatif, qui serait retrouvé dans la rate et le poumon (Gupta 1999). CXCL12 est le seul ligand connu du récepteur CXCR4.

Chez l'homme, de nombreuses cellules expriment CXCR4 à l'état physiologique, particulièrement les lymphocytes –pré-B, B, et T CD4⁺ -, les polynucléaires, les cellules dérivées des monocytes et les cellules dendritiques, les CSHs, les neurones et astrocytes, et les cellules endothéliales. De nombreuses lignées transformées ou cancéreuses expriment CXCR4. Enfin, les souris KO pour CXCR4 comme pour CXCL12 présentent un phénotype létal.

3.2.2.2 CXCR7

N'échappant pas au phénomène de redondance caractéristique des systèmes chimiokines/récepteurs, la relation exclusive CXCL12/CXCR4 a été récemment brisée par la découverte d'une affinité élevée de CXCL12 pour un autre GPCR, CXCR7 (*Balabanian 2005, Burns 2006*). CXCR7, initialement nommé RDC1, est codé par une région proche de celle codant pour CXCR4 sur le chromosome 2 chez l'homme. CXCL12 ainsi que CXCL11 auraient la capacité de se lier et d'activer ce récepteur (*Burns 2006*).

CXCR7 est présent à la surface de certains lymphocytes, neutrophiles et monocytes, cellules endothéliales, neurones et astrocytes et cellules embryonnaires et tumorales (*Balabanian 2005, Thellen 2007, Burns 2006*). De façon singulière, la liaison CXCL12/CXCR7 entraîne une internalisation du récepteur (*Balabanian 2005*) mais pas de mobilisation du calcium intracellulaire, le récepteur CXCR7 ne possédant pas la séquence nécessaire au couplage avec la protéine G_{ai}. CXCR7 agirait ainsi comme un récepteur non-signalant dont la réponse spécifique au type cellulaire serait conditionnée par la présence concomitante de CXCR4 (*Thellen 2007*). L'activation de CXCR7 serait impliquée dans la prolifération, l'adhésion, voire le chimiotactisme de populations cellulaires spécifiques. Cet effet est bien démontré dans certaines lignées cellulaires embryonnaires, transformées ou cancéreuses, mais demeure sujet à débats concernant les cellules adultes différenciées (*Maksym 2009*).

3.2.3 Régulation du système CXCL12/CXCR4

3.2.3.1 Régulation de CXCR4

Régulation de l'expression. La transcription basale du gène codant pour CXCR4 est essentiellement sous la dépendance du promoteur NRF-1. Cependant cette transcription peut aussi être régulée par des signaux intracellulaires (calcium / AMPc) sous le contrôle d'interleukines (IL-2, -4, -7, -10, -15), de facteurs de croissance (FGF, TGF, VEGF, EGF) ou de cytokines de l'inflammation comme le TNF- α , l'INF- γ ou l'IL-1 β . En outre, des phénomènes de glycosylation ou de sulfation des tyrosines peuvent moduler l'expression protéique de CXCR4 (*Busillo 2007*)

Colocalisations membranaires. Comme de nombreux GPCRs, CXCR4 peut s'homooligomériser spontanément, ou former des hétéro-dimères avec d'autres récepteurs, en

particulier CCR5 et CXCR7. Les conséquences de tels arrangements demeurent sujettes à controverse. Citons enfin la possibilité de localisation préférentielle du récepteur au sein de lipid-rafts pourrait favoriser la réponse cellulaire à l'interaction CXCL12/CXCR4.

Signalisation. La régulation de la réponse à CXCR4 dépend de trois phénomènes communs aux GPCRs : la désensibilisation, l'internalisation et la dégradation. Le phénomène de désensibilisation engage des protéines kinases qui inhibent la réponse de CXCR4 en cas de stimulation continue par son ligand. L'internalisation puis la dégradation de CXCR4 après son activation par CXCL12 obéissent à des mécanismes conventionnels, le récepteur CXCR4 subissant majoritairement une dégradation lysosomale et donc peu de recyclage vers la membrane.

3.2.3.2 Protéolyse de CXCL12

CXCL12 active CXCR4 en suivant deux étapes (*Crump 1997*). La liaison initiale dépend de la séquence N-terminale 12-17 de CXCL12 qui entraîne une modification conformationnelle du récepteur. En second temps, l'activation de CXCR4 est médiée spécifiquement par les acides aminés 1 à 8 de CXCL12.

Le clivage protéolytique constitue une des formes de régulation de l'activité des chimiokines. CXCL12 peut être clivée en N-terminal ou en C-terminal par des MMPs qui inhibent ainsi sa fonction en détruisant son site de liaison et/ou d'activation du récepteur CXCR4 (*Delgado 2001, Valenzuela-Fernandez 2002, Villalba 2003, de la Luz Sierra 2004*). Les MMPs 1, 2, 3, 9, 13 et 14 sont ainsi capable d'altérer la structure de CXCL12. Notons que CXCL12 peut se lier à certains composants de la MEC comme les héparane-sulfates, formant ainsi un gradient de concentration extracellulaire dépendant de l'organisation et la composition de la MEC (*Hoogewerf 1997*). Il semblerait que la liaison à ceux-ci améliorerait l'activité de CXCL12 et protégerait celle-ci de la protéolyse (*McQuibban 2001*).

En 2001, l'équipe de C Overall et C Power a montré que MMP-2 clivait spécifiquement CXCL12 au niveau du cinquième acide aminé, générant ainsi une forme clivée majoritaire, SDF-1(5-67), incapable de se lier et d'activer CXCR4 (*McQuibban 2001*). En 2003, ces mêmes auteurs ont démontré que le clivage de CXCL12 par la MMP-2 synthétisée par des macrophages infectés par le VIH est associé à une neurotoxicité induite (*Zhou 2003*).

3.2.3.3 Interaction SDF-1(5-67) / CXCR3

Le récepteur CXCR3 est essentiellement connu comme étant exprimé à la surface de certains lymphocytes comme les Th1, les CD8+, les lymphocytes B activés et les NKs. Récemment, de nombreuses études ont démontré que ce récepteur était aussi exprimé à la surface des cellules endothéliales humaines sous forme d'un variant nommé CXCR3B (*Lasagni 2003*). Schématiquement, CXCR3A est impliqué dans le chimiotactisme des lymphocytes alors que CXCR3B apparaît aujourd'hui comme un récepteur majeur d'angiostatisme et d'inhibition de croissance tumorale. L'activation de CXCR3B par un de ses trois ligands connus –CXCL9, CXCL10, CXCL11- a été rapporté comme responsable d'une apoptose endothéliale majeure par l'intermédiaire de différentes voies de signalisation, notamment l'activation de la caspase-3 et de p53. Depuis, CXCR3 a été détecté au sein de populations cellulaires variées comme les astrocytes, les neurones, et les cellules d'origine mésenchymateuse du rein et du colon. Certaines cellules malignes expriment CXCR3 (mélanome, neuroblastome, cancer du sein et du poumon).

Récemment, une étude de Vergote *et al* a suggéré que SDF-1(5-67) induisait une apoptose neuronale par l'intermédiaire de ce récepteur CXCR3 (*Vergote 2006*). Les travaux de Vergote ont ainsi identifié que l'effet apoptotique de la chimiokine clivée SDF-1(5-67) était lié à son affinité pour un autre récepteur, établissant ainsi une balance entre les effets cytoprotecteurs de CXCL12 *via* CXCR4 et les effets pro-apoptotiques de SDF-1(5-67) *via* CXCR3 comme l'illustre la **Figure 7**.

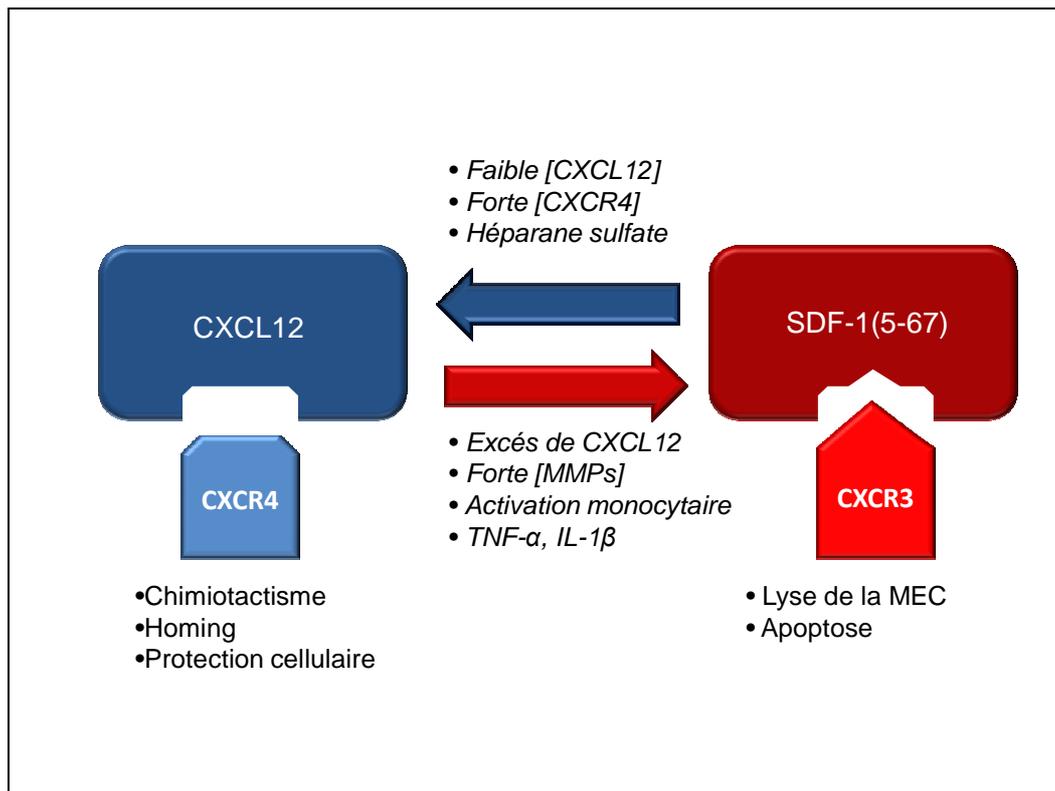


Figure 7 : Modélisation de la dualité fonctionnelle de CXCL12 et SDF-1(5-67). Facteurs de régulation et effets des interactions ligand/récepteur pour CXCR3 et CXCR4.

3.2.4 CXCL12 et œil

Peu d'études concernent l'implication de CXCL12 dans les fonctions oculaires. En 2000, l'équipe de Forrester a montré que les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien exprimaient à la fois CXCR4 et CXCL12. Ils ont démontré *in vitro* que l'expression de CXCR4 était modulée par certaines cytokines pro-inflammatoires et que l'activation du récepteur entraînait la synthèse de certaines chimiokines comme CXCL8, CXCL1 et CCR2. Enfin, ces cellules épithéliales, qui constituent une des barrières hémato-rétiniennes, migraient en réponse à CXCL12, suggérant une fonction rétinienne homéostatique et angiogénique du couple CXCL12/CXCR4. D'autres ont analysé la localisation postérieure de CXCR4 qui semble prédominer au niveau de l'épithélium pigmentaire et de la choroïde (Buttho 2006). La comparaison avec des rétines atteintes de DMLA à des stades avancés semblait montrer une réduction de l'expression du récepteur comparativement à une population contrôle appariée en âge, sans pour autant présumer d'une quelconque implication physiopathologique. Il faut ici souligner qu'aucune fonction angiogénique directe de CXCL12/CXCR4 n'a été démontrée dans l'organisme.

Dans l'uvéite, l'expression de CXCR4 à la surface des lymphocytes Th1 de l'humeur aqueuse serait augmentée par l'exposition aux glucocorticoïdes (*Curnow 2004*). Dans la cornée, CXCL12 et CXCR4 ont été détectés au sein des kératocytes du stroma (*Bourcier 2004*).

Le screening des gènes régulés par l'exposition au TGF- β 2, une des cytokines retrouvée en forte concentration dans l'humeur aqueuse des patients atteints de GPAO, a permis de mettre en évidence une expression basale et inductible de CXCL12 par les cellules trabéculaires en culture (*Zhao 2004*). Notons de plus qu'une analyse récente de l'expression des chimiokines par les cellules trabéculaires *in vitro* a retrouvé une synthèse basale de CXCL6, CXCL8 et CCL2 (*Shifera 2010*).

3.3 CX3CL1 et son récepteur

3.3.1 Chimiokine CX3CL1

CX3CL1 (fractalkine) a été identifiée pour la première fois par Bazan *et al* en 1997 (*Bazan 1997*). Elle est l'unique chimiokine en CX3C-. Chez l'homme, cette protéine est constituée de 373 acides aminés essentiellement répartis en un domaine actif (76 AAs), un domaine mucine-like, et un domaine transmembranaire. Ainsi CX3CL1 présente la singularité -avec CXCL16- d'exister sous une forme membranaire et une forme soluble après clivage par ADAM-10 et -17 au niveau d'un motif dibasique situé en C-terminal.

CX3CL1 a été initialement détectée sous sa forme membranaire exprimée par les cellules endothéliales. Son site mucine-like permettrait une adhésion forte des leucocytes circulant à l'endothélium vasculaire et contribuerait ainsi à l'extravasation vers les sites inflammatoires, en association avec certaines intégrines comme VCAM-1 et ICAM-1.

Plus récemment, CX3CL1 a été détecté dans d'autres populations cellulaires comme les cellules dendritiques, les cellules épithéliales des muqueuses intestinales et bronchiques, les kératinocytes ainsi que les fibroblastes cutanés. Dans le système nerveux central, CX3CL1 est une des chimiokines les plus exprimées à l'état physiologique par les neurones et aussi les astrocytes.

Son expression est essentiellement stimulée par les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β et l'INF- γ . La forme soluble du récepteur à l'IL-6 ainsi que l'hypoxie –*via HIF-1*– inhibent son expression.

3.3.2 Récepteur CX3CR1

CX3CR1 est l'unique GPCR connu de CX3CL1. C'est une molécule de 355 AAs codés par la région p21 du chromosome 3 chez l'homme. Chez la souris, ce récepteur nommé mCX3CR1 est constitué de 353 acides aminés et présente 83% d'homologie de séquence avec la protéine humaine. CX3CR1 est essentiellement exprimé chez l'homme par certaines populations leucocytaires, notamment les lymphocytes T cytotoxiques CD3+CD4+ et CD3+CD8+, les NK CD56+, les monocytes et cellules phagocytiques dérivées des monocytes CD16+CD14+ /-, ainsi que les cellules dendritiques. De plus, de nombreuses cellules cancéreuses expriment ce récepteur.

CX3CR1 est activé de façon comparable par la forme membranaire et la forme soluble de CX3CL1. La liaison CX3CL1/CX3CR1 induit l'adhésion et la migration endothéliale des cellules circulantes, ainsi que l'activation et la dégranulation des effecteurs cytotoxiques. L'effet chimiotactique de CX3CL1 implique l'activation du récepteur *i.e.* la cascade de signaux intracellulaires initiée par les protéines G.

3.3.3 Rôle physiopathologique de CX3CL1

3.3.3.1 Allergie

L'expression sérique de CX3CL1 ainsi que l'expression membranaire de CX3CR1 à la surface des lymphocytes semble être augmentée au cours de l'asthme et la rhinite allergiques. De plus, la surexpression de CX3CR1 à la surface des cellules épithéliales bronchiques et musculaires lisses serait à l'origine du recrutement mastocytaire dans l'allergie (*El Chazly 2006*).

3.3.3.2 Athérosclérose

Le système CX3CL1/CX3CR1 agit comme un puissant facteur d'adhésion leucocytaire à la membrane. De nombreuses études menées avec des souris KO pour CX3CL1 ou CX3CR1 sur

fond ApoE^{-/-} ou LDLR^{-/-} ont rapporté que le déficit en CX3CR1 réduisait la formation des plaques d'athérosclérose ainsi que le recrutement tissulaire des monocytes (*Combadiere 2003*). De plus, la découverte d'un polymorphisme génétique du récepteur (variant CX3CR1^{I249/M280}) rencontré chez environ 25% de la population représenterait un facteur de protection contre les maladies cardio-vasculaires (*McDermott 2003*).

3.3.3.3 Neuroinflammation

La mise au point de lignées murines CX3CR1^{gfp/+} et CX3CR1^{gfp/gfp} a joué un rôle crucial dans l'identification des fonctions immunitaires de ce récepteur. Le recrutement des cellules mononuclées (macrophages résidents, mastocytes, cellules dendritiques) serait sous le contrôle de CX3CL1/CX3CR1. En pathologie, l'absence de fonctionnalité du récepteur réduit l'infiltration des monocytes et NKs dans des modèles de rejet de greffe cardiaque (*Haskell 2001*) ou d'encéphalite (*Wong 2006*).

La chimiokine CX3CL1 semble plus exprimée dans le SNC que dans le reste de l'organisme. Elle régulerait essentiellement le renouvellement de la microglie et assurerait la communication entre les neurones et la microglie dont les conséquences complexes demeurent encore mal comprises (*Cardonna Nat NeuroSci 2006*).

3.3.4 CX3CL1 et œil

En 2003, l'étude de la localisation oculaire humaine de CX3CL1 a révélé une synthèse basale de celle-ci dans le segment antérieur –cornée, iris et corps ciliaires- ainsi qu'au niveau choroïdien (*Silverman 2003*). De plus, CX3CL1 a été détecté dans l'humeur aqueuse dans l'uvéite et la rétinopathie diabétique proliférante (*Fang 2005, You 2007*).

Les propriétés angiogéniques de CX3CL1 ont été confirmées *ex vivo* et *in vivo* sur des cornées de lapin (*You 2007, Pillai 2008*). De plus, l'utilisation d'un anticorps bloquant a permis de diminuer la néovascularisation rétinienne dans un modèle animal de rétinopathie diabétique (*You 2007*).

Au niveau de la surface oculaire, l'utilisation de lignées transgéniques a permis d'étudier le renouvellement des cellules dendritiques CX3CR1⁺ au sein de la cornée, dont la densité dépendrait de CX3CL1 dans des conditions physiologiques. Ainsi, il a été démontré que l'absence du récepteur CX3CR1 entraînait une diminution de l'infiltration inflammatoire

macrophagique de la conjonctive dans un modèle murin de brûlure de la surface oculaire par base (Chinery 2008). L'analyse de ces résultats sera discutée plus loin. On peut en outre noter que la concentration lacrymale de CX3CL1 serait plus élevée en cas de sécheresse oculaire et inversement proportionnelle au débit de sécrétion lacrymale évalué cliniquement (Enriquez-de-Salamanca 2010).

Les principaux travaux concernant l'implication de CX3CL1 en pathologie oculaire concernent néanmoins la DMLA. L'étude du polymorphisme de CX3CR1 a ainsi révélé que le variant M280 –déjà étudié en pathologie cardiovasculaire- prédisposerait à l'apparition d'une DMLA (Combadiere 2007, Raoul 2008, Raoul 2010). L'utilisation de souris KO pour CX3CR1 a permis de démontrer que l'absence du récepteur était associée à une accumulation de cellules microgliales dans les espaces sous-rétiniens, entraînant d'une part une cytotoxicité locale accrue au niveau de la couche des photorécepteurs, et d'autre part une néoangiogenèse choroïdienne *via* la synthèse accrue de VEGF par les microglies accumulées. Ces résultats mettent en avant l'implication essentielle de cette chimiokine dans la régulation du trafic de certaines cellules immunitaires au sein des tissus oculaires.

4 OBJECTIFS GENERAUX

Comme nous l'avons précédemment détaillé, le GPAO demeure aujourd'hui un problème de santé publique en raison de ses conséquences visuelles délétères d'une part et des problématiques thérapeutiques liées au manque de connaissances physiopathologiques ainsi qu'à la iatrogénicité des traitements d'autre part. Le réseau chimiokinergique apparaît aujourd'hui comme un système majeur de communication intercellulaire et serait impliqué dans de nombreuses pathologies dysimmunes mais aussi des pathologies extra-immunitaires dégénératives. En outre, l'utilisation d'antagonistes spécifiques de certains récepteurs aux chimiokines, dont l'application en ophtalmologie demeure à développer, pourraient offrir des perspectives thérapeutiques ciblées au cours de certaines affections oculaires.

Les mécanismes physiopathologiques mis en cause dans la régulation de la PIO et dans la trabéculopathie glaucomateuse demeurent mal connus. Les altérations morphologiques et cellulaires observées au cours de la dégénérescence trabéculaire glaucomateuse d'une part et l'implication récemment décrite de CXCL12 et sa forme tronquée dans la régulation du microenvironnement et de la viabilité cellulaires d'autre part nous ont conduits à formuler l'hypothèse selon laquelle CXCL12 pourrait jouer un rôle sur l'HTO au cours du GPAO. Les objectifs de cette thèse étaient donc (i) de déterminer *ex vivo* l'expression de la chimiokine, sa forme clivée et ses récepteurs au sein de trabéculums humains glaucomateux, (ii) d'étudier *in*

vitro l'expression basale et inductible de ceux-ci sur lignée trabéculaire, (iii) de tester *in vivo* des antagonistes non-peptidiques spécifiques de CXCR3 et CXCR4 dans un modèle animal de glaucome, et (iv) de déterminer les mécanismes cellulaires mis en jeu dans la régulation de la fonction trabéculaire par CXCL12 et ses récepteurs.

En parallèle, notre équipe est depuis longtemps impliquée dans les problèmes d'observance thérapeutique associés à l'inflammation iatrogène de la surface oculaire faisant suite à l'utilisation de collyres antiglaucomateux conservés. Compte-tenu de l'infiltration inflammatoire conjonctivale induite par l'exposition au BAC et des propriétés chimiotactiques spécifiques de CX3CL1, nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle cette chimiokine pourrait participer à la régulation du trafic des cellules immunitaires au niveau de la surface oculaire. Nos objectifs étaient (i) d'étudier *ex vivo* l'expression conjonctivale de cette chimiokine chez des patients glaucomateux traités au long cours, (ii) de déterminer le rôle du système CX3CL1/CX3CR1 dans les interactions entre cellules épithéliales conjonctivales et leucocytes humains en culture sous l'influence du BAC, puis (iii) d'analyser l'infiltration conjonctivale par des cellules inflammatoires dans un modèle de toxicité oculaire animale chez la souris KO pour CX3CR1 afin de déterminer *in vivo* l'influence de ce système dans l'inflammation iatrogène de la surface oculaire.

RESULTATS

1 IMPLICATION DU CLIVAGE PROTEOLYTIQUE DE CXCL12 DANS LA TRABECULOPATHIE GLAUCOMATEUSE (Article 1)

1.1 Synthèse

Le glaucome est une des premières causes de cécité dans le monde. Le GPAO est une neuropathie rétinienne généralement initiée par une dysfonction trabéculaire pathologique responsable d'une HTO. Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la trabéculopathie glaucomateuse sont aujourd'hui inconnus. Ainsi, les traitements hypotonisants conventionnels, qui ne ciblent pas la pathologie initiale, demeurent non-curatifs. Outre ses propriétés au sein du système immunitaire, la chimiokine CXCL12 participe à la régulation de l'homéostasie tissulaire en régulant la viabilité cellulaire et le remodelage de la MEC par l'intermédiaire de son principal récepteur: CXCR4. Il a été récemment décrit que le clivage protéolytique de CXCL12 générait une forme tronquée, SDF-1(5-67), capable d'induire une apoptose cellulaire en se liant à un autre récepteur, CXCR3. Dans notre étude, CXCL12, CXCR3 et CXCR4 ont été détectés dans des trabéculums de patients glaucomateux ainsi qu'au sein d'une lignée de cellules trabéculaires glaucomateuses (HTM3). *In vivo*, l'utilisation d'un antagoniste non-peptidique spécifique de CXCR3 a permis de diminuer la PIO en restaurant la fonction trabéculaire et en diminuant l'apoptose dans un modèle animal de glaucome. Au contraire, un antagoniste de CXCR4 est sans effet. *In vitro*, les cellules trabéculaires expriment CXCL12 et SDF-1(5-67). Leur synthèse est régulée par des cytokines $-TNF-\alpha$ et $TGF-\beta_2$ impliquées dans la pathologie glaucomateuse. Dans un modèle d'apoptose induite par le BAC, CXCL12 protège les cellules trabéculaires en se liant à CXCR4 alors que SDF-1(5-67) potentialise l'apoptose induite par l'intermédiaire de CXCR3 et l'activation des voies de la caspase-3. L'utilisation d'antagonistes spécifiques de CXCR3 et CXCR4 a confirmé le rôle de chacun d'entre eux dans la régulation de la viabilité cellulaire. Ces résultats démontrent le rôle de CXCL12 dans la physiopathologie trabéculaire (**Figure 8**) et rapportent de façon originale que l'utilisation *in vivo* d'un antagoniste de

CXCR3 permet de diminuer significativement l'HTO en restaurant la fonction trabéculaire dans un modèle animal de glaucome, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques qui cibleraient spécifiquement un système chimiokine/récepteur dans cette pathologie.

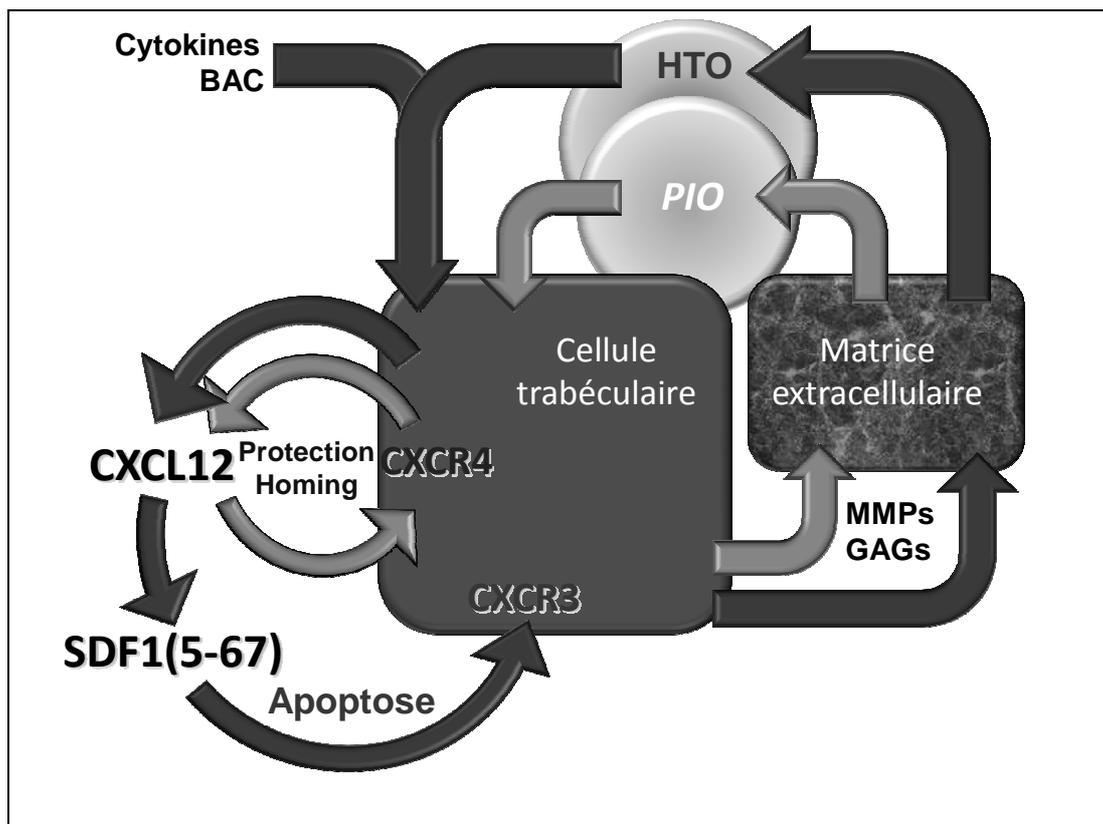


Figure 8 : Résumé des résultats de nos travaux sur la trabéculopathie glaucomateuse : modélisation de l'homéostasie trabéculaire régulée par l'équilibre entre CXCL12 et SDF-1(5-67). Cycle en gris clair : fonction autocrine de CXCL12 qui induit protection et homing des cellules trabéculaires en conditions physiologiques. Cycle en gris foncé : Dérégulation de la fonction trabéculaire associée à l'HTO et à la présence de cytokines et MMPs impliquées dans le glaucome qui fait basculer l'équilibre vers SDF-1(5-67) cytotoxique *via* CXCR3.

1.2 Objectifs

- *Déterminer l'expression de CXCL12, CXCR3 et CXCR4 au sein de trabéculums humains glaucomateux.*
- *Etudier la synthèse basale et inductible de CXCL12, SDF-1(5-67), CXCR3 et CXCR4 in vitro au sein d'une lignée trabéculaire humaine glaucomateuse.*
- *Evaluer les effets de CXCL12 et SDF-1(5-67) sur la viabilité trabéculaire.*
- *Tester les effets in vivo d'antagonistes non-peptidiques spécifiques de CXCR3 et CXCR4 sur la pression intraoculaire dans un modèle animal de glaucome.*
- *Comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués in vivo dans la régulation de la pression intraoculaire induite par l'inhibition de CXCR3.*

1.3 Méthodologie

L'ensemble des matériels et méthodes est décrit dans l'article 1. Les différents réactifs utilisés sont détaillés dans le **Tableau 4**.

Les tissus trabéculaires humains ont été prélevés sur 15 patients traités pour un GPAO depuis plus d'un an et nécessitant une chirurgie filtrante, dans le cadre du Centre d'Investigation Clinique du CHNO des Quinze-Vingts (INSERM-DHOS CIC, 503) après accord du comité d'éthique et en conformité avec la déclaration d'Helsinki (2000).

Les expériences *in vitro* ont été réalisées sur lignée humaine de cellules trabéculaires spontanément immortalisées obtenues d'un patient âgé glaucomateux (HTM3), lignée dont les caractéristiques ont été précédemment établies (*Pang 1994*).

L'expérimentation animale a été réalisée sur un modèle de rat glaucomateux (mâles Long-Evans âgés de 6 à 8 semaines, Janvier, France) secondaire à une HTO expérimentale obtenue par cautérisation des veines épisclérale comme détaillé précédemment, au sein de la plateforme de phénotypage de l'Institut de la Vision et en conformité avec la déclaration de l'ARVO sur l'expérimentation animale en ophtalmologie.

Tableau 4 : Protéines, anticorps, sondes et primers utilisés (article 1).

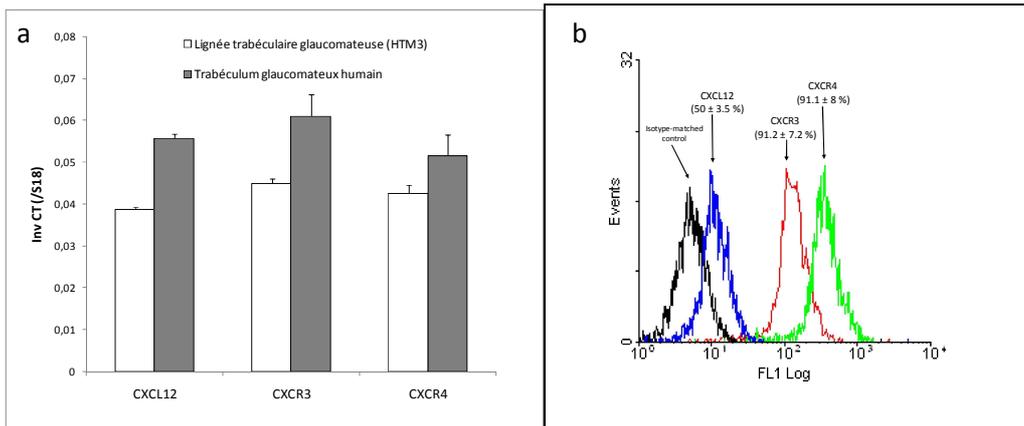
Type	Référence	Source
Protéines	CXCL12 TNF- α TGF- β 2 TIMP-1	R&D Systems, USA
	CXCL9	Peprotech, USA
	CXCL10	
	CXCL12 SDF-1(5-67)	Institut Pasteur (F Balleux)
Antagonistes	Batimastat (100nM)	CNRS UMR7149 (S Menashi)
	AMD3100 (0,01 à 1 μ M)	Orga-Links, Gif-sur-Yvette
	NBI74330 (0,01 à 1 μ M)	Université d'Alberta, Canada (C Overall)
Anticorps primaires (vs antigènes humains)	CXCL12 mAb (1:200) CXCR4 mAb (1:200) CXCR3 mAb (1:200)	R&D Systems
	caspase 3 (clone 92-605)	BD Biosciences
	CXCR7 mAb (1:200)	Institute for Research in Biomedicine, Suisse (M Thelen)
	SDF-1(5-67) pAb	Université d'Alberta, Canada (C Overall)
	CXCL12 (ELISA, DY350)	R&D Systems
Anticorps primaires (vs antigènes de rat)	CD45 pAb (1:100) CD11b mAb (1:200)	Abcam, USA
Sondes d'apoptose	TUNEL	Roche Diagnostics, Meylan
	Hoechst33258	Hoechst, Allemagne
Primers	CXCL12 (Hs00171022m1) CXCR4 (Hs00607978s1) CXCR3 (Hs00171041m1)	Applied Biosystems, USA

1.4 Résultats

1.4.1 Expression de CXCL12, SDF-1(5-67) CXCR3 et CXCR4 dans le trabéculum glaucomateux humain et dans une lignée cellulaire trabéculaire glaucomateuse

CXCL12, CXCR3 et CXCR4 sont exprimés dans les trabéculums humains glaucomateux et dans la lignée trabéculaire humaine glaucomateuse HTM3. Les ARNm de CXCL12, CXCR3 et CXCR4 ont été détectés dans le trabéculum de patients glaucomateux ainsi que dans une lignée humaine trabéculaire glaucomateuse (**Figure 9a**). L'expression protéique de la chimiokine et des récepteurs a été confirmée en immunohistofluorescence ainsi qu'en immunocytométrie de flux (intensité moyenne de fluorescence par cellule :MFI = $3,2 \pm 0,1$, $14,1 \pm 0,2$ et $39,4 \pm 0,2$ respectivement pour CXCL12, CXCR3 et CXCR4) (**Figure 9b,c,d**). En microscopie confocale, l'étude des récepteurs CXCR3 et CXCR4 a révélé une répartition membranaire caractéristique des GPCRs en « hot spots » à la surface des HTM3 (**Figure 9e,f**). La libération extracellulaire de CXCL12 par les HTM3 a été confirmée par ELISA ($22,8 \pm 5,28$ pg/ml pour 100000 cellules / ml).

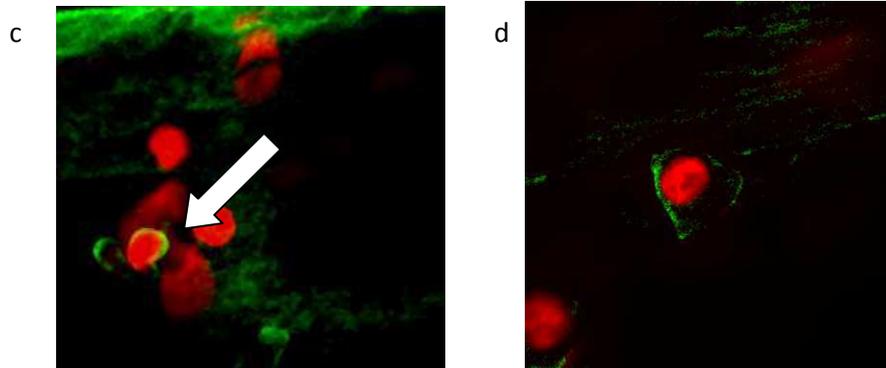
Nous avons ensuite étudié l'influence de certaines cytokines précédemment décrites comme étant surexprimées au cours de la pathologie glaucomateuse :le TNF- α et le TGF- β 2. Une stimulation par TNF- α (50 ng/mL) augmente les ARNm de CXCL12, CXCR3 et CXCR4 (12h) ainsi que leur expression protéique (24h) quantifiée en CMF (**Figure 10a,b**). La stimulation par TGF- β 2 (10 ng/mL) augmente également significativement l'expression – ARNm et protéine- de CXCL12 et CXCR4 mais pas celle de CXCR3.



CXCR3

CXCR4

Tissu trabéculaire



Lignée trabéculaire HTM3

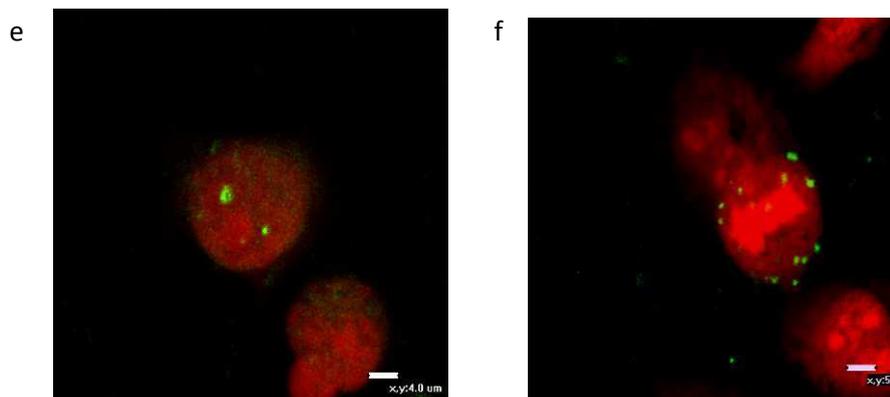


Figure 9 : Expression basale de CXCL12, CXCR3 et CXCR4 dans le trabéculum glaucomateux humain et dans une lignée humaine trabéculaire glaucomateuse (HTM3). (a) détection des ARNm en RT-PCR. (b) détection des protéines en CMF. (c,d) détection des récepteurs sur tissu trabéculaire en immunohistofluorescence (coloration des noyaux en IP, immunofluorescence secondaire en vert, microscopie confocale, $\times 400$). (e,f) détection des récepteurs sur lignée HTM3 en immunofluorescence : aspect caractéristique des GPCRs en « hot spots » (microscopie confocale, $\times 600$).

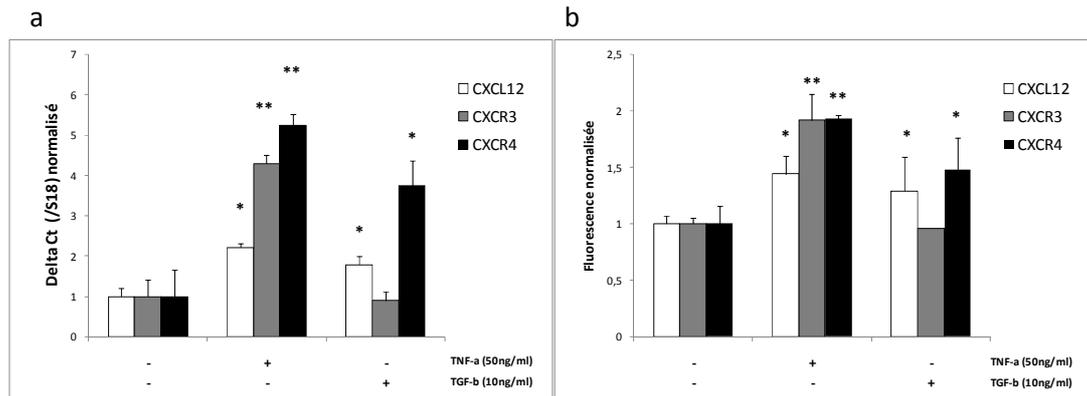


Figure 10 : Expression inducible de CXCL12, CXCR3 et CXCR4 par la lignée glaucomateuse trabéculaire HTM3 en réponse au TNF- α et au TGF- β 2. (a) Détection des ARNm en Q-PCR. (b) Intensité de fluorescence par cellule mesurée en CMF. ANOVA :* : $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$.

Les cellules trabéculaires glaucomateuses synthétisent SDF-1(5-67). Une analyse protéique par Western-Blot a été réalisée à l'aide d'un anticorps spécifiquement conçu pour se lier au néo-épitope de la chimiokine tronquée SDF-1(5-67). Une source exogène de CXCL12 et de SDF-1(5-67) a été utilisée pour tester la spécificité de l'anticorps. SDF-1(5-67) est détecté dans les HTM3 en l'absence de stimulation (**Figure 11a,b**). L'utilisation concomitante d'inhibiteurs des MMPs – le batimastat (100 nM) et le TIMP-1 (0,5 nM)- diminue significativement l'expression de SDF-1(5-67), confirmant que sa production est déterminée par l'activité protéolytique des MMPs, particulièrement les MMP-2, -3 et -9. A l'inverse, une stimulation par TNF- α ou TGF- β 2 augmente sa synthèse, révélant une corrélation positive entre la synthèse de CXCL12 et celle de sa forme clivée.

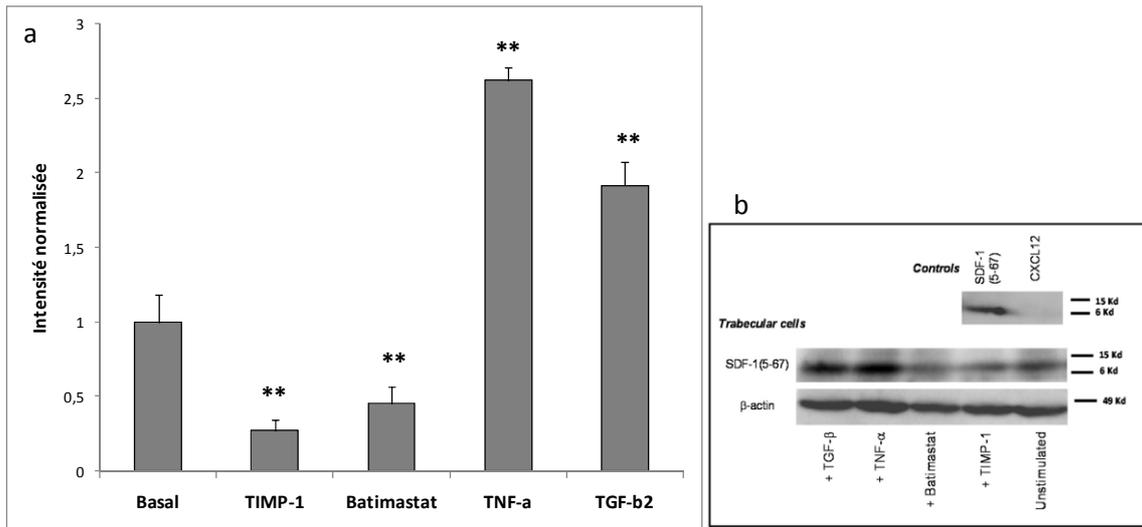


Figure 11: Expression de SDF-1(5-67) analysée par Western Blot réalisé avec un anticorps spécifiquement développé contre le néo-épitope de la chimiokine clivée. La concentration spécifique de SDF-1(5-67) dans les cellules est diminuée en présence d'inhibiteurs des MMPs et augmentée après stimulation par TNF- α (50 ng/ mL) ou TGF- β 2 (10 ng/ mL). ANOVA : ** : $P < 0,01$.

1.4.2 Relations entre CXCL12 et ses récepteurs

CXCL12 active CXCR4 et mobilise le calcium intracellulaire. Une imagerie calcique a été réalisée afin d'évaluer les effets de CXCL12 et SDF-1(5-67) sur les flux calciques intracellulaires. Les cellules ont été incubées dans un tampon Heps-Tris (pH=7,4) avec 5 μ M de FURA-4 pendant 45 minutes à 37°C puis stimulées avec les chimiokines. Les stimulations par PBS ou par Kcl (3mM) ont servi respectivement de contrôle négatif et positif. La concentration relative de calcium intracellulaire (excitation à 470 nm pendant 150 ms, 3dB) a été mesurée sur 15 cellules par échantillon. Une stimulation par CXCL12 entraîne une mobilisation rapide de calcium, qui n'est pas influencée par l'adjonction concomitante de SDF-1(5-67) (**Figure 12**). La stimulation par SDF-1(5-67) seul n'induit pas de variation importante du flux calcique intracellulaire. L'utilisation d'un antagoniste spécifique de CXCR4, l'AMD3100, inhibe la mobilisation de calcium intracellulaire induite par CXCL12.

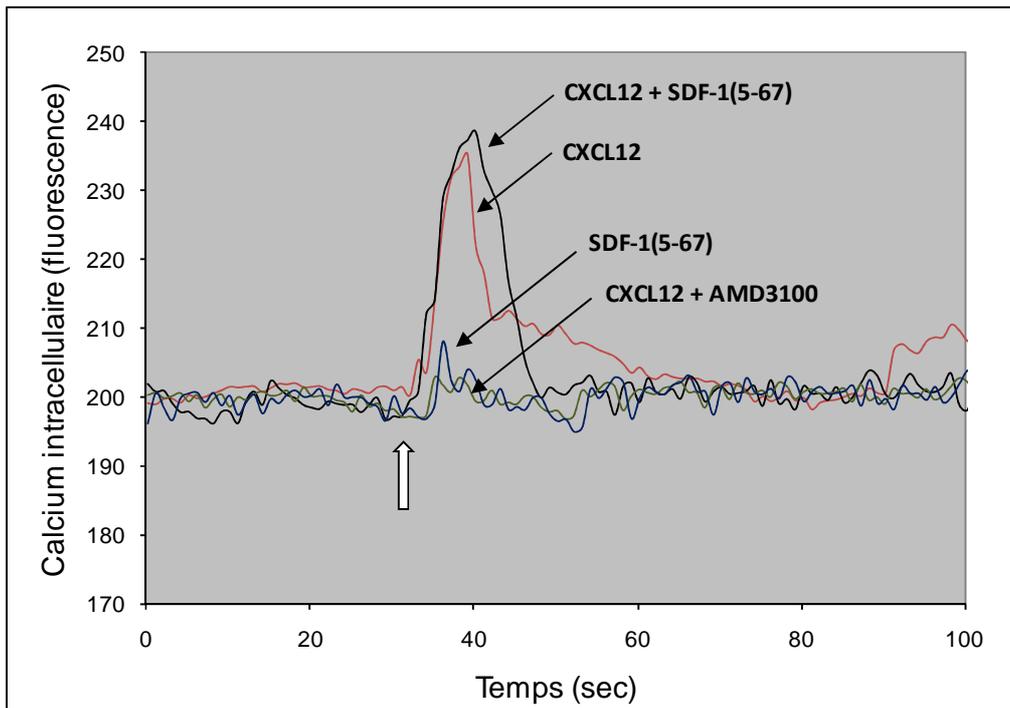


Figure 12 : Fonctionnalité des récepteurs en fonction des ligands CXCL12 et SDF-1(5-67) en imagerie calcique. CXCL12 induit un afflux de calcium intracytoplasmique qui est inhibé par blocage sélectif de CXCR4 (AMD3100). L'adjonction de SDF-1(5-67) n'influence pas la mobilisation de calcium induite par CXCL12.

CXCL12 et SDF-1(5-67) induisent respectivement une internalisation des récepteurs CXCR4 et CXCR3. Afin d'étudier la sélectivité des ligands CXCL12 et SDF-1(5-67) pour les deux récepteurs, nous avons évalué l'expression membranaire de CXCR4 et CXCR3 par CMF en présence des chimiokines. Une stimulation exogène par CXCL12 (10 ng/mL) entraînait une réduction de l'expression membranaire de CXCR4 six heures après la stimulation, alors qu'une stimulation par SDF-1(5-67) (10 ng/mL) induit une diminution de l'expression membranaire de CXCR3 (**Figure 13**). CXCR7, récemment décrit comme un nouveau corécepteur pour CXCL12 a aussi été testé. Une faible expression membranaire de celui-ci a été détectée en CMF (Intensité de fluorescence moyenne à $1,7 \pm 0,09$). Les stimulations par CXCL12 ou SDF-1(5-67) ne modifiaient pas son expression.

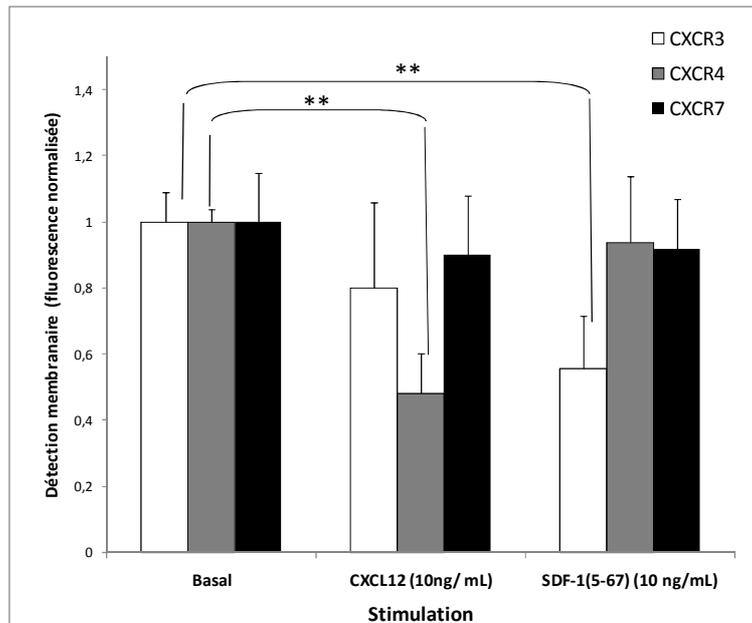


Figure 13 : Variation de l'expression membranaire des récepteurs CXCR3, CXCR4 et CXCR7 en fonction des stimulations. CXCL12 induit une internalisation de CXCR4 alors que SDF-1(5-67) induit une internalisation de CXCR3. L'expression membranaire de CXCR7 n'est pas modifiée (détection membranaire de l'expression des récepteur en CMF normalisée à l'expression basale). ANOVA, ** : $P < 0,01$.

1.4.3 Effets de CXCL12 et SDF-1(5-67) sur la viabilité cellulaire et rôle de CXCR3 et CXCR4

CXCL12 protège de l'apoptose induite par le BAC alors que SDF-1(5-67) augmente l'apoptose des cellules trabéculaires. La raréfaction des cellules trabéculaires participe aux altérations pathologiques qui caractérisent la trabéculopathie glaucomateuse. Nous avons utilisé un modèle d'apoptose cellulaire induite par le BAC précédemment décrit par notre équipe. Les HTM3 ont été exposées à un stress toxique aigu (BAC 0,01% soit $3,3 \cdot 10^{-4}$ M, 15 min), puis ont été cultivées pendant 24 h en présence ou non de chimiokines recombinantes. L'apoptose a été mesurée par microcytofluorométrie et rapportée à la viabilité cellulaire. Le modèle génère environ 50% d'apoptose par rapport au témoin. CXCL12 diminue l'effet proapoptotique du BAC alors que le SDF-1(5-67) augmente l'apoptose des HTM3 (**Figure 14a**). Les effets protecteur/délétère sont dose-dépendants, avec un effet maximum observé pour une concentration de 10 ng/mL. (**Figure 14b**)

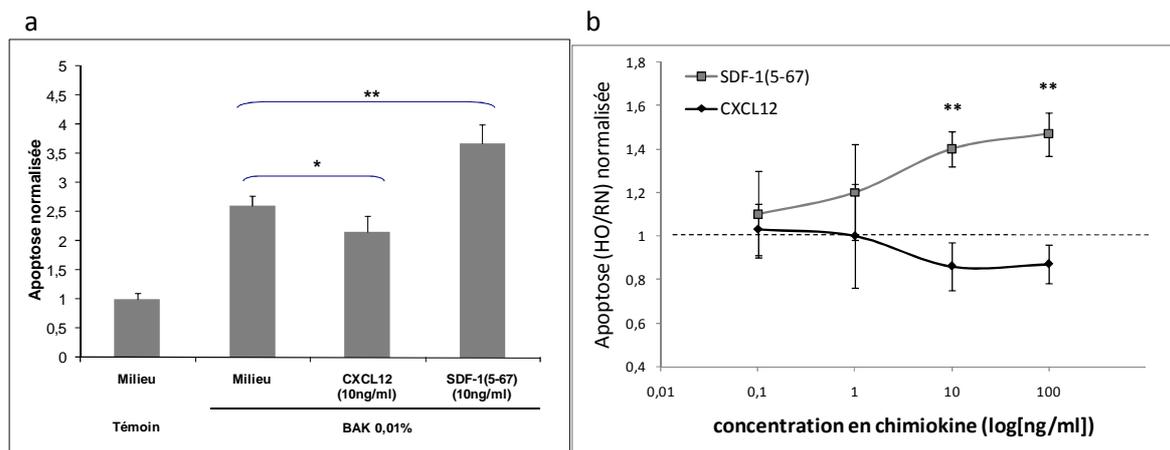


Figure 14 : Effet de CXCL12 et SDF-1(5-67) sur l'apoptose trabéculaire évaluée par microcytométrie (intensité du marquage Hoechst [HO] rapportée à la viabilité cellulaire évaluée en rouge neutre [RN]) dans un modèle de toxicité. (a) CXCL12 protège de l'apoptose cellulaire induite par le BAC alors que SDF-1(5-67) augmente l'apoptose. (a) l'effet protecteur de CXCL12 et l'effet proapoptotique de SDF-1(5-67) sont dose-dépendants avec un maximum d'efficacité observé pour une concentration de 10ng/ml. ANOVA, * : $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$.

SDF-1(5-67) induit une apoptose trabéculaire via CXCR3. Après avoir montré que CXCL12 et SDF-1(5-67) se liaient respectivement à CXCR4 et CXCR3, nous avons testé les effets d'antagonistes non-peptidiques spécifiques de ces deux récepteurs - l'AMD3100 pour CXCR4 et le NBI74330 pour CXCR3 – dans notre modèle cellulaire d'apoptose induite par le BAC. Le blocage de CXCR4 inhibe l'effet protecteur de CXCL12 qui devient alors proapoptotique et mime l'effet de SDF-1(5-67). I-TAC/CXCL11, un autre ligand de CXCR7, n'influence pas la viabilité trabéculaire, confirmant que l'effet protecteur de CXCL12 est médié par CXCR4. **(Figure 15)**

Le blocage de CXCR3 inhibe l'effet pro-apoptotique de SDF-1(5-67). Pour confirmer le rôle de CXCR3, nous avons testé un de ses ligands : IP-10/CXCL10. Une exposition de 24 h à 10 ng/mL de CXCL10 reproduit un effet analogue à celui engendré par SDF-1(5-67). Le blocage de CXCR3 par le NBI74330 inhibe l'effet pro-apoptotique de CXCL10, confirmant ainsi le rôle de CXCR3. En revanche, CXCL11 (I-Tac), un autre ligand de CXCR3, n'influence pas l'apoptose cellulaire. L'étude des voies de signalisation en CMF a montré que la liaison de SDF-1(5-67) au récepteur CXCR3 induit une activation de la caspase 3 intracellulaire, une des principales voies impliquées dans les phénomènes apoptotiques **(Figure 16).**

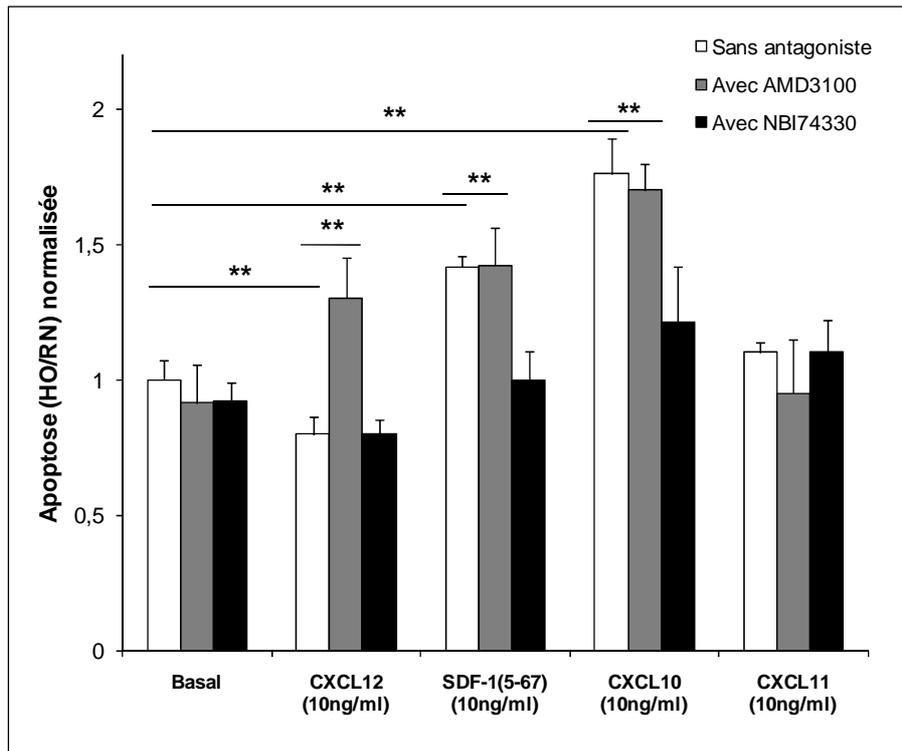


Figure 15 : Effets de CXCL12/CXCR4 et SDF-1(5-67)/CXCR3 sur un modèle d'apoptose trabéculaire induite par le BAC (représentée par l'intensité de fluorescence du colorant Hoechst [HO] normalisée à la viabilité cellulaire évaluée par coloration rouge neutre [RN], microcytométrie en lumière froide). L'utilisation d'antagonistes spécifiques a permis de déterminer le rôle de chacun des récepteurs. CXCL12 protège les cellules *via* CXCR4 alors que SDF-1(5-67) augmente l'apoptose *via* CXCR3.

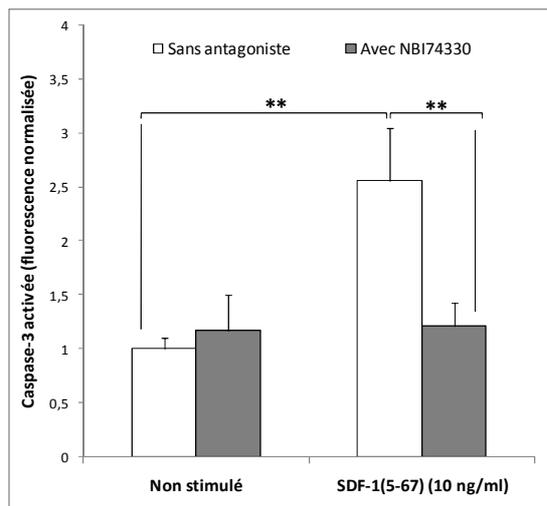


Figure 16 : Voie de signalisation de l'effet proapoptotique de l'interaction SDF-1(5-67)/CXCR3. Une augmentation significative de l'activation de la caspase-3 est détectée en CMF après stimulation par SDF-1(5-67). L'effet est inhibé suite au blocage de CXCR3 par le NBI74330. ANOVA, **: $P < 0,01$.

1.4.4 Effets *in vivo* des antagonistes non-peptiques spécifiques de CXCR3 et CXCR4 dans un modèle animal de glaucome.

L'utilisation in vivo d'un antagoniste de CXCR3 diminue la PIO dans un modèle animal de glaucome, alors que le blocage de CXCR4 n'a pas d'effet sur la PIO. Nous avons testé *in vivo* les antagonistes précédemment utilisés de façon à confirmer nos résultats *in vitro*. Un modèle d'HTO chirurgicalement induite par cautérisation des veines épisclérales a été évalué chez le rat Long-Evans. Cette procédure expérimentale a permis de sélectionner des animaux qui présentaient une HTO induite stable pendant un mois ($36 \pm 3,2$ vs 27 ± 3 mmHg). L'injection sous-conjonctivale de NBI74330 (10 ng/mL, 100 μ L) induit une réduction significative de la PIO trois jours après (**Figure 17a**). L'effet d'une seule injection est transitoire, les valeurs de PIO recouvrant leur niveau élevé six jours après l'injection. L'administration d'une seconde injection de NBI74330 selon les mêmes modalités au moment du pic d'efficacité de la première a permis de prolonger l'effet hypotonisant pendant douze jours. L'étude de doses a permis de montrer une concentration minimum efficace de 1 μ M par injection (**Figure 17b**)

A l'inverse, l'administration sous-conjonctivale d'une ou plusieurs doses d'AMD3100 n'a pas modifié la PIO. Enfin, ni le NBI74330 ni l'AMD3100 n'ont d'effet sur la PIO des yeux témoin n'ayant pas subi de cautérisation des veines (**Figure 17c**).

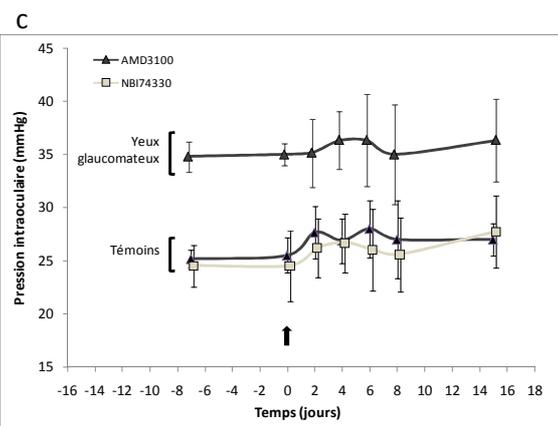
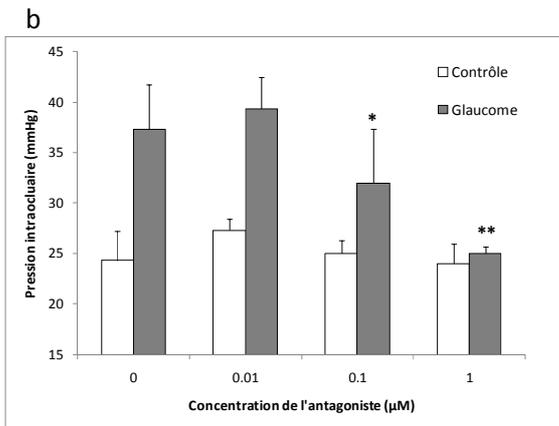
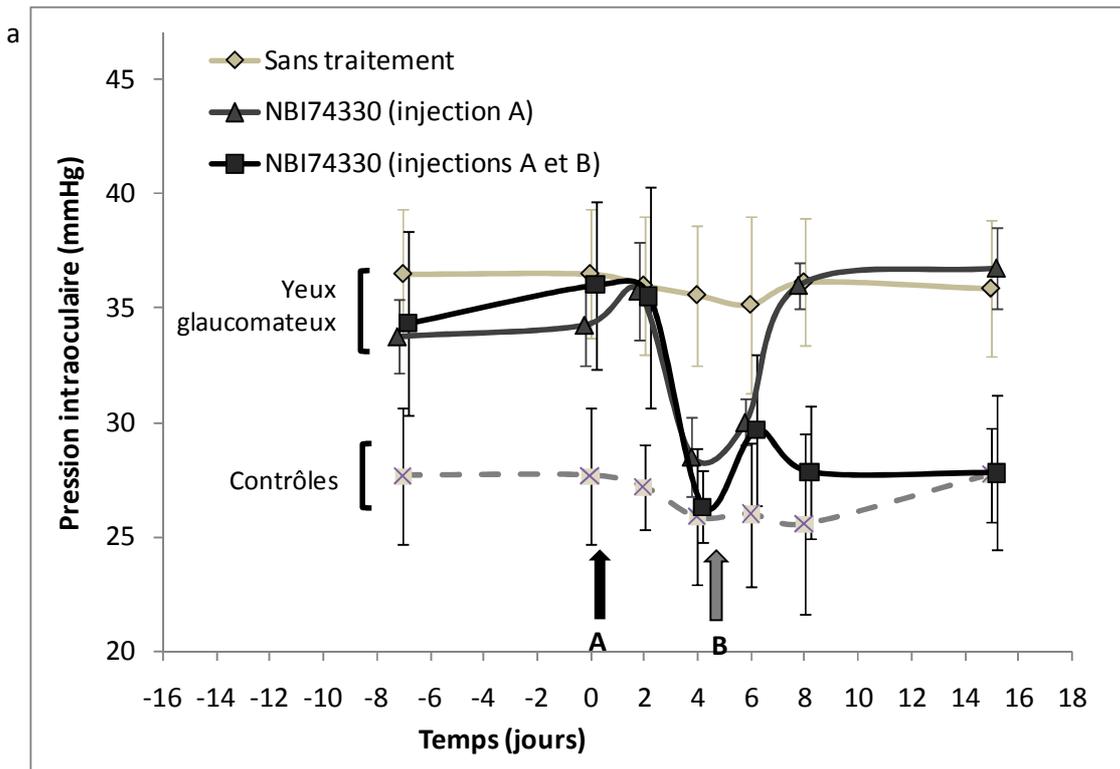


Figure 17 : Effet *in vivo* du blocage de CXCR3 et de CXCR4 par des antagonistes spécifiques sur la pression intraoculaire. (a) l'injection sous-conjonctivale de NBI74330 (antagoniste de CXCR3) réduit significativement l'HTO pendant 6 jours (une injection) et jusqu'à la fin de l'expérimentation (deux injections). (b) Effet hypotonisant dose-dépendant de l'antagoniste de CXCR3 : le NBI74330. (c) l'injection sous-conjonctivale d'AMD3100 (antagoniste de CXCR4) n'a pas d'effet sur la PIO des yeux glaucomateux et témoins, le NBI n'a pas d'effet sur la PIO des yeux témoins. Mann Whitney's U-test, * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$.

Le blocage de CXCR3 in vivo restaure la fonction trabéculaire et diminue la PIO dans un modèle animal de glaucome. Nous avons complété nos travaux *in vivo* afin de déterminer les mécanismes responsables de l'HTO dans le modèle ainsi que de la baisse de PIO induite par le NBI74330. Le débit de filtration de l'humeur aqueuse a été évalué par fluorophotométrie *in vivo* : 5 µl de fluorescéine ont été injectés en chambre antérieure et la cinétique de décroissance de la fluorescence a été mesurée sous anesthésie générale. Le potentiel de filtration trabéculaire a été déterminé *ex vivo* par injection de microsphères fluorescentes et microscopie confocale : l'évaluation des zones de captation des microsphères rapportée à la surface trabéculaire totale (PEFL) reflète ainsi la fonction de filtration trabéculaire. Indépendamment de tout traitement, l'évaluation de notre modèle a révélé que l'élévation expérimentale de la PIO conduisait à terme à une diminution du renouvellement de l'humeur aqueuse associée à une réduction de la filtration trabéculaire, représentée par le pourcentage de la longueur de fixation du traceur sur le trabéculum (PEFL). L'injection de NBI74330 améliore le renouvellement de l'humeur aqueuse ainsi que la filtration trabéculaire dans les yeux glaucomateux, révélant ainsi une restauration de la fonction trabéculaire comparable à celle des yeux témoins non-glaucomateux (**Figures 18a,b et Figures 19a,b**).

L'apoptose des cellules trabéculaires a ensuite été évaluée *ex vivo* par TUNEL sur les trabéculums de rat. Notre modèle de glaucome augmente significativement la densité de cellules apoptotiques au sein du trabéculum comparativement aux trabéculums contrôles. Le traitement par NBI74330 diminue l'apoptose trabéculaire dans les yeux glaucomateux traités comparativement aux yeux non traités (**Figure 20a,b**).

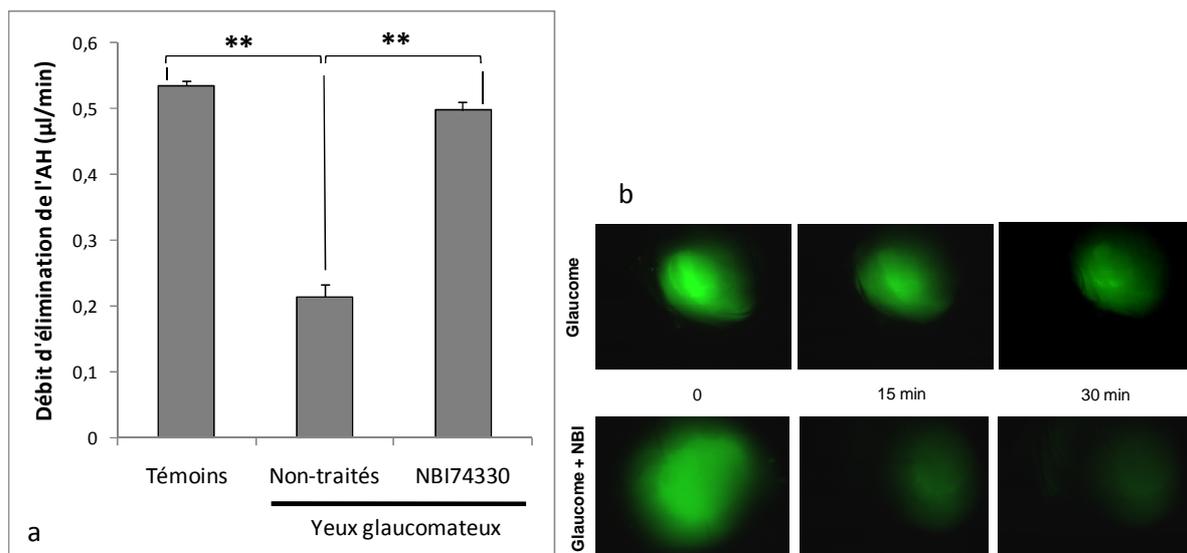


Figure 18 : Renouvellement de l’humeur aqueuse [HA] évalué par fluorophotométrie (N=10). (a) Le modèle de glaucome s’accompagne d’une diminution du débit d’élimination de l’HA. Deux injections sous-conjonctivales de NBI74330 restaurent une élimination de l’HA comparable à celle des yeux témoins non-glaucomeux. (b) L’intensité de fluorescence de la chambre antérieure après injection de fluorescéine décroît d’autant plus rapidement que le débit d’élimination de l’HA est élevé, ce qui est le cas en présence de NBI. *Mann Whitney’s U-test, ** :P<0,01.*

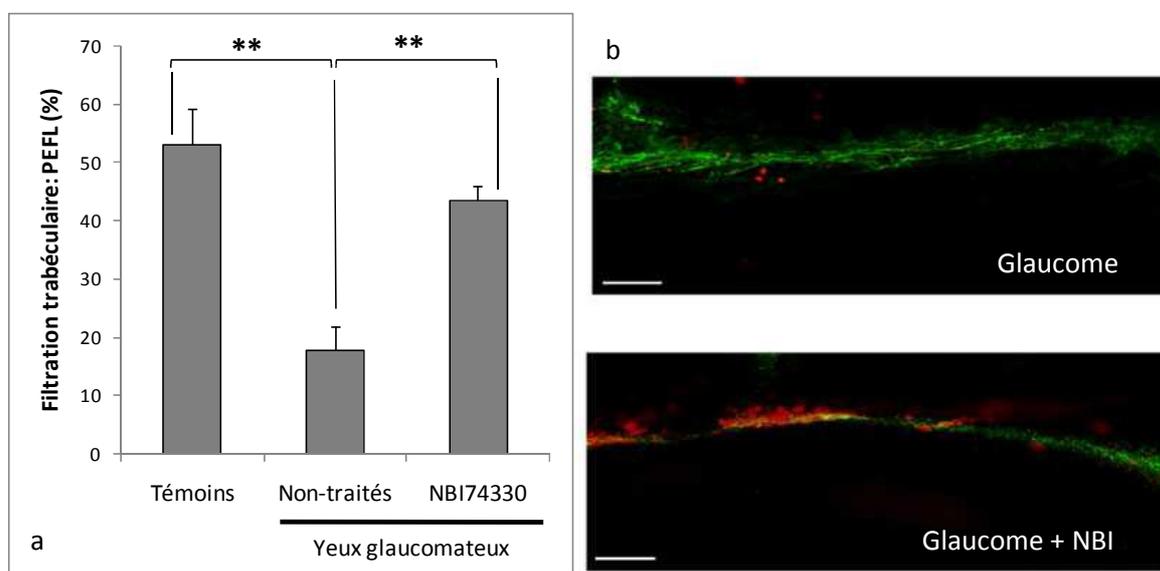


Figure 19 : Evaluation de la filtration trabéculaire (PEFL) par mesure des zones de captation de microsphères fluorescentes (diamètre=0,1µm) (N=10). (a) Le modèle animal de glaucome entraîne une diminution significative de la filtration trabéculaire. Deux injections de NBI74330 restaurent une fonction trabéculaire comparable à celle des yeux témoins non-glaucomeux. (b) Les zones de fixation du traceur (rouge) occupent une surface trabéculaire (vert) plus importante en cas de traitement par NBI74330, illustrant une meilleure fonction trabéculaire. (microscopie confocale, ×100). *Mann Whitney’s U-test, ** :P<0,01.*

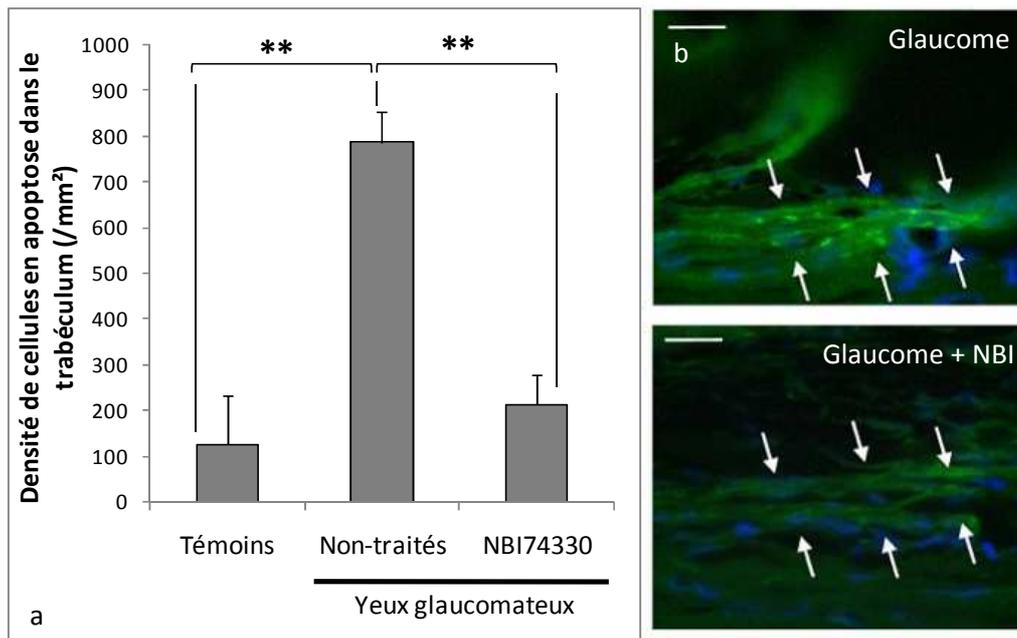


Figure 20 : Evaluation de l'apoptose trabéculaire par marquage TUNEL (N=20). (a) le modèle animal de glaucome induit une apoptose trabéculaire significative. Deux injections sous-conjonctivales de NBI74330 diminuent l'apoptose trabéculaire. (b) La densité de cellules apoptotiques (vert) parmi les cellules trabéculaires (noyau en DAPI, bleu) est très inférieure en cas de traitement par NBI74330. ANOVA, **:P<0,01.

Le SDF-1(5-67) entraîne une élévation de la pression intraoculaire in vivo. Finalement, des injections sous-conjonctivales de SDF-1(5-67) (100 ng/mL, 100 µL) dans des yeux de rats sains induit une élévation significative et transitoire de la PIO (**Figure 21**).

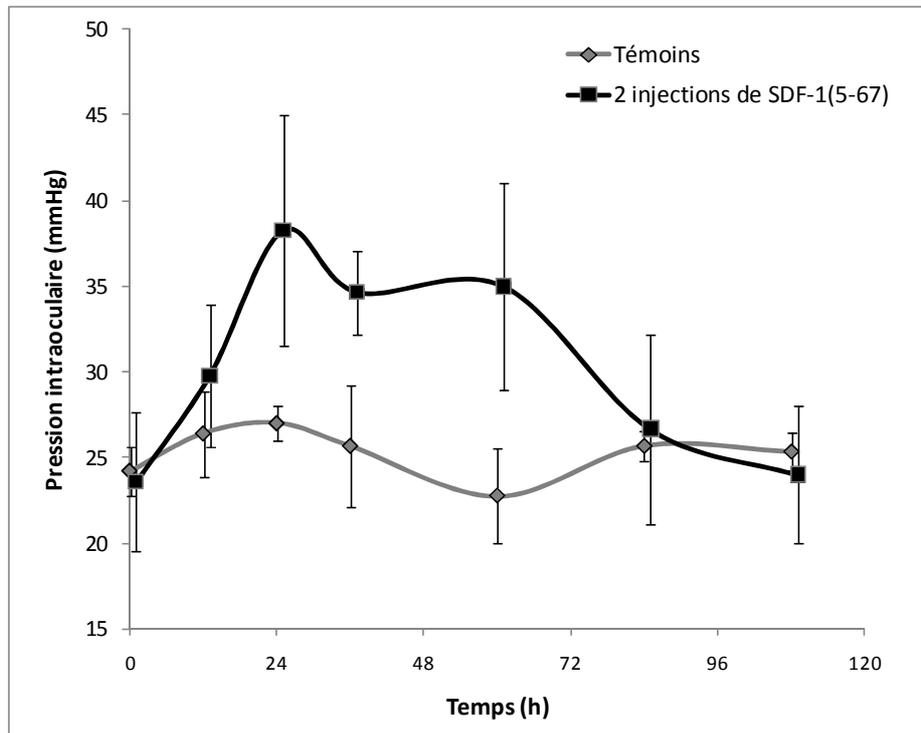


Figure 21: Effet de SDF-1(5-67) sur la pression intraoculaire (N=10). Deux injections sous-conjonctivales à 12 heures d'intervalle de SDF-1(5-67) (100 ng/mL, 100µL) entraînent une élévation transitoire de la pression intraoculaire. Mann Whitney's U-test, ** :P<0,01.

Nous démontrons ainsi de façon originale qu'il existe une balance entre la chimiokine entière CXCL12 et sa forme clivée SDF-1(5-67) qui régule l'apoptose des cellules trabéculaires et la fonction du trabéculum *via* deux systèmes distincts : CXCL12/CXCR4 et SDF-1(5-67)/CXCR3. Nous démontrons *in vivo* que la diminution de la filtration trabéculaire responsable de l'HTO dans notre modèle est liée à une apoptose trabéculaire accrue qui peut être inhibée en bloquant CXCR3 par un antagoniste non-peptidique spécifique administré localement. Ces résultats offrent de nouvelles pistes thérapeutiques contre le GPAO qui cibleraient directement la trabéculopathie causale en agissant sur l'effet apoptotique d'un GPCR.

2 RÔLE DE CX3CL1 DANS L'INFLAMMATION DE LA SURFACE OCULAIRE INDUITE PAR LE CHLORURE DE BENZALKONIUM (article 2)

2.1 Synthèse

Les conservateurs des collyres sont responsables d'effets iatrogènes toxiques au sein de la surface oculaire qui diminuent la tolérance des traitements antiglaucomateux, nuisant à l'observance ainsi qu'à l'efficacité de toute stratégie thérapeutique. Il a été démontré que le BAC induisait une apoptose des cellules épithéliales conjonctivales, une surexpression épithéliale de médiateurs de l'inflammation ainsi qu'une infiltration conjonctivale par des cellules de l'inflammation. Cependant, les mécanismes responsables d'une telle infiltration demeurent méconnus : plus précisément, il n'a jamais été déterminé si cette migration cellulaire était simplement secondaire à une destruction tissulaire toxique non-spécifique, ou bien directement liée à un effet proinflammatoire du BAC encore inconnu. La chimiokine CX3CL1 joue un rôle déterminant dans la migration et l'activation de certaines populations leucocytaires exprimant son unique récepteur :CX3CR1 (*Bazan 1997*). L'expression épithéliale de CX3CL1 participerait au trafic de cellules de l'immunité et serait impliquée dans des pathologies oculaires comme la DMLA (*Combadière 2007*). Compte-tenu des phénomènes migratoires observés au sein de la conjonctive exposée au BAC et du rôle fondamental de CX3CL1/CX3CR1 dans l'infiltration inflammatoire des tissus, nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle CX3CL1 pourrait participer à l'effet proinflammatoire du BAC. Chez l'homme, nous montrons sur des empreintes conjonctivales et par CMF que l'épithélium des patients traités par des collyres conservés surexprime CX3CL1 par rapport à un groupe comparable de patients non exposés aux conservateurs. *In vitro*, la stimulation d'une lignée de cellules épithéliales conjonctivales par des concentrations habituelles de BAC induit une synthèse accrue de CX3CL1 par l'intermédiaire du système TNF- α /TNF-R1. Cette synthèse s'accompagne d'un effet chimioattractant sur certaines populations leucocytaires, particulièrement CD3+, CD56+ ou CD14+, inhibé en cas de blocage du système CX3CL1/CX3CR1. Dans un modèle animal de toxicité oculaire, l'exposition au BAC induit une migration de cellules inflammatoires vers la conjonctive. On observe chez les souris KO pour le récepteur CX3CR1 une diminution de l'infiltration macrophagique F4/80+ induite par le BAC. Cette étude démontre de façon originale (**Figure 22**) que le système

CX3CL1/CX3CR1 participe à l'interaction entre les cellules épithéliales conjonctivales et les cellules de l'immunité, et que la migration conjonctivale d'une population macrophagique en réponse au BAC dépend spécifiquement de ce système chimiokinergique.

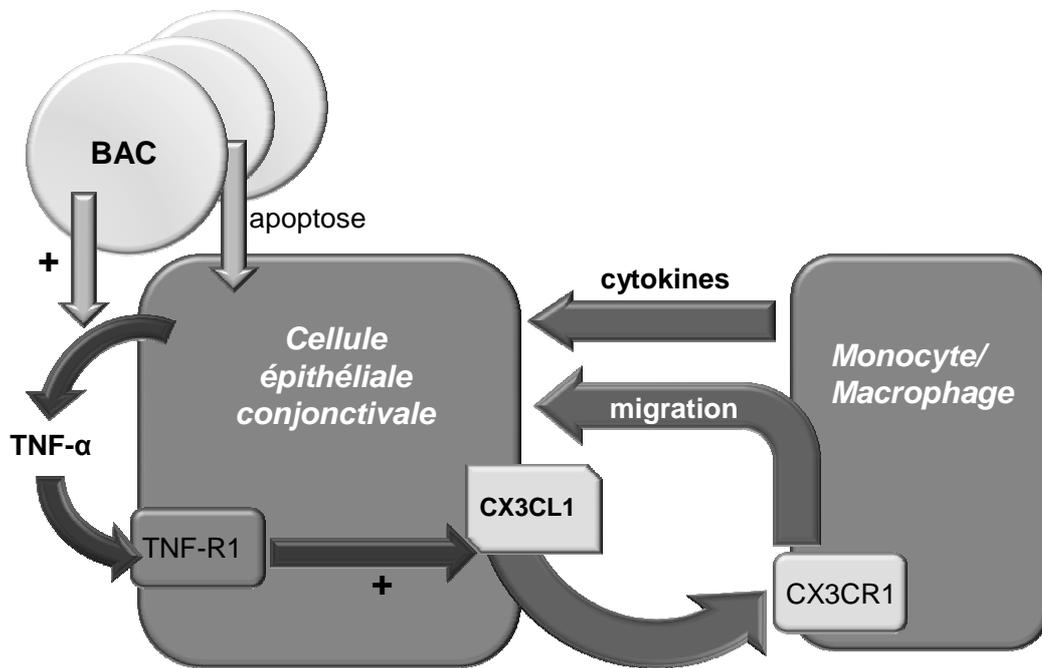


Figure 22 : Modélisation du rôle de la chimiokine CX3CL1 dans l'interaction entre cellules épithéliales conjonctivales et monocytes/macrophages. L'exposition au chlorure de benzalkonium (BAC) entraîne une surexpression conjonctivale de CX3CL1 (par l'intermédiaire du système TNF- α /TNF-R1) qui participe à l'infiltration macrophagique et à la libération de cytokines pro-inflammatoires.

2.2 Objectifs

- *Evaluer et comparer la synthèse épithéliale conjonctivale de CX3CL1 et CX3CR1 chez des patients glaucomateux traités par des collyres contenant du BAC.*
- *Déterminer l'induction de synthèse de CX3CL1 et CX3CR1 par le BAC et les mécanismes mis en jeu.*
- *Etudier les effets chimioattractants de CX3CL1 synthétisée par les cellules épithéliales in vitro.*
- *Déterminer le rôle de CX3CL1 dans l'infiltration conjonctivale par des leucocytes dans un modèle animal de toxicité au BAC chez la souris KO pour CX3CR1.*

2.3 Méthodologie

L'ensemble des matériels et méthodes est décrit dans l'article 2. Les principaux réactifs utilisés sont détaillés dans le **Tableau 5**.

Les empreintes conjonctivales de 40 patients glaucomateux traités depuis plus d'un an avec un collyre contenant du BAC (n=20) ou un collyre sans conservateur (n=20) ont été recueillies dans le cadre du Centre d'Investigation Clinique des Pathologies de la Surface Oculaire (Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts, INSERM-DHOS CIC 503, Paris, France) en conformité avec la déclaration d'Helsinki (2000) après accord du Comité de Protection des Personnes (Ile de France V, agrément 10793) et signature d'un consentement éclairé.

Les expérimentations *in vitro* ont été réalisées sur une lignée humaine de cellules épithéliales conjonctivales immortalisées (IOBA-NHC) dont les caractéristiques ont été établies

précédemment (*Diebold 2003*). Les essais de migration ont été réalisés avec une culture primaire de leucocytes humains isolés sur culot sanguin obtenus par l'intermédiaire du CTS Saint-Antoine, Paris.

Une lignée de souris transgéniques CX3CR1^{gfp/gfp} sur fond C57BL/6 a été développée pour l'étude animale (*Jung 2000*). Les expérimentations ont été conduites au sein de la plate-forme de phénotypage de l'Institut de la Vision, en accord avec les critères de l'ARVO sur l'expérimentation animale en ophtalmologie. Le modèle de toxicité oculaire consiste en l'instillation d'une solution de BAC à 0,05% (15 gouttes à 5 minutes d'intervalle dans l'œil testé) suivie d'une période de récupération de 12 heures avant euthanasie et prélèvements (*Ichijima 1992, Liang 2008*).

Tableau 5 : Protéines, anticorps et primers utilisés (article 2).

Type	Référence	Source
Protéines	TNF- α	R&D Systems, USA
Anticorps primaires, CMF. <i>(vs antigènes humains)</i>	HLA-DR mAb (1:50)	DakoCytomation, Danemark
	CX3CL1 mAb (1:200) CX3CR1 mAb (1:500)	Imgenex, USA
	CD45, CD3, CD14, CD56 immunomarquage multi-couleur direct(Cyto-Stat6607073, 6603909)	Beckman Coulter, USA
Anticorps primaires, IF et ELISA. <i>(vs antigènes humains)</i>	CX3CL1 (ELISA, DY365)	R&D Systems
	CX3CL1 mAb (1:200) CX3CR1 mAb (1:200)	Abcam, USA
Anticorps primaires, IF. <i>(vs antigènes murins)</i>	CD3 (1:200) CD11b (1:200) NKG2D (1:100) F4/80 (1:500)	R&D Systems
Primers	CX3CL1, CX3CR1 (PrimerBlast)	Eurogentec

2.4 Résultats

2.4.1 Expression conjonctivale de CX3CL1 chez les patients glaucomateux bénéficiant d'un traitement contenant du BAC

CX3CL1 et HLA-DR sont surexprimées dans la conjonctive des patients recevant un traitement avec conservateur. Grâce à la mise au point de la technique des empreintes conjonctivales couplée à la CMF, notre équipe avait précédemment démontré que le BAC induisait la synthèse épithéliale de marqueurs de l'inflammation chez l'homme (Baudouin 2005). Dans cette étude, nous avons testé l'expression conjonctivale de CX3CL1, CX3CR1 et HLA-DR. Une faible synthèse basale de CX3CL1, CX3CR1 et HLA-DR a été mise en évidence dans le groupe témoin (patients glaucomateux traités avec des collyres sans conservateur). CX3CL1 et HLA-DR sont significativement surexprimées chez les patients recevant un traitement contenant du BAC (Figure 23).

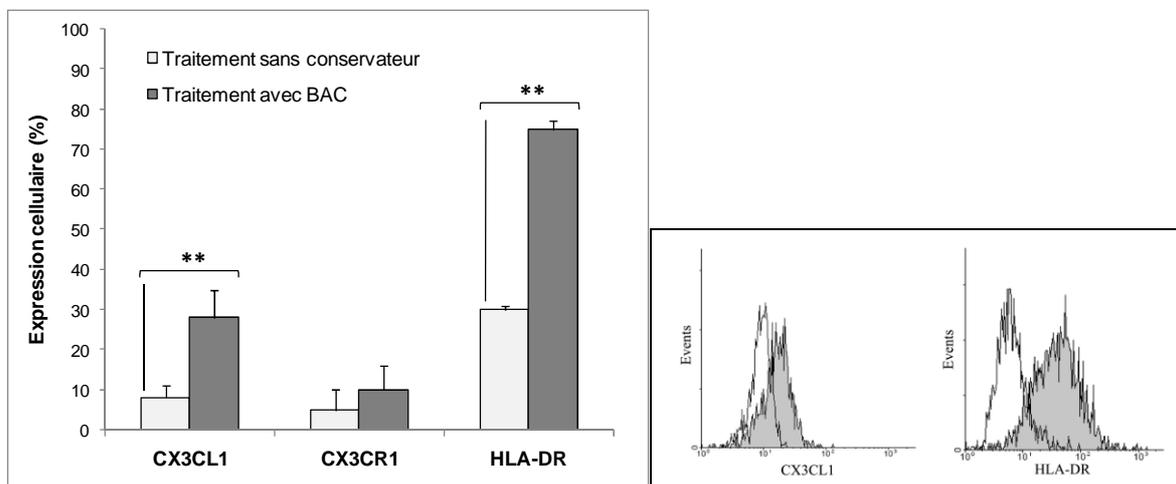


Figure 23 : Expression conjonctivale de CX3CL1, CX3CR1 et HLA-DR évaluée par empreintes et cytométrie en flux chez des patients glaucomateux recevant un traitement local avec ou sans BAC. L'expression de CX3CL1 et HLA-DR est significativement plus élevée dans le groupe BAC. ANOVA, ** : $P < 0,01$.

Le niveau d'expression de CX3CL1 est corrélé aux lésions cliniques de la conjonctive. Les détails de l'évaluation clinique de la surface oculaire sont présentés dans le **Tableau 4**. Nous rapportons que le niveau d'expression de CX3CL1 par les cellules épithéliales conjonctivales

est positivement corrélé aux lésions conjonctivales évaluées cliniquement selon le score de Van Bijsterveld. Aucune corrélation significative n'a été retrouvée pour les autres paramètres étudiés (**Tableau 6**).

Tableau 6 :Analyse des relations entre les différentes caractéristiques des patients étudiés et le niveau d'expression de CX3CL1 évalué par empreintes conjonctivales et cytométrie de flux.

	Caractéristiques des patients	Corrélation avec l'expression de CX3CL1
Durée du traitement [années]	9 ± 4,6	R ² =0,015, p>0,05
Nombre de traitements	2,25 ± 0,6	R ² =0,07, p>0,05
Hyperhémie conjonctivale [0 – 5]	1,75 ± 0,65	R ² =0,247, p>0,05
Lésions conjonctivales [0 – 9]	1,7 ± 1,36	R²=0,723, p=0,012*
Temps de rupture lacrymale (BUT) [sec]	7,5 ± 2.5	R ² =0,248, p>0,05

2.4.2 Expression basale et inductible de CX3CL1/CX3CR1 in vitro

Le BAC induit in vitro une surexpression de CX3CL1. L'expression de CX3CL1 et de son récepteur a été étudiée sur une lignée immortalisée de cellules épithéliales conjonctivales (IOBA-NHC) par RT-PCR, immunofluorescence, CMF et ELISA. De façon comparable à ce qui avait été observé *ex vivo* par empreintes conjonctivales et CMF, une stimulation par le BAC induit une surexpression de CX3CL1, et pas de CX3CR1, comme analysé en RT-PCR et en immunofluorescence (**Figure 24a,b**). L'effet du BAC sur l'expression de CX3CL1 est dose-dépendant et temps-dépendant (**Figure 24c,d**). L'analyse de la cinétique de l'expression cellulaire totale et membranaire a été réalisée en CMF et révèle une expression membranaire précoce de CX3CL1 (6 heures après la stimulation) suivie d'une surexpression totale prolongée sur 24 heures (**Figure 24d**). Le dosage de CX3CL1 dans le milieu par ELISA révèle une libération rapide de CX3CL1 (**Figure 24e**).

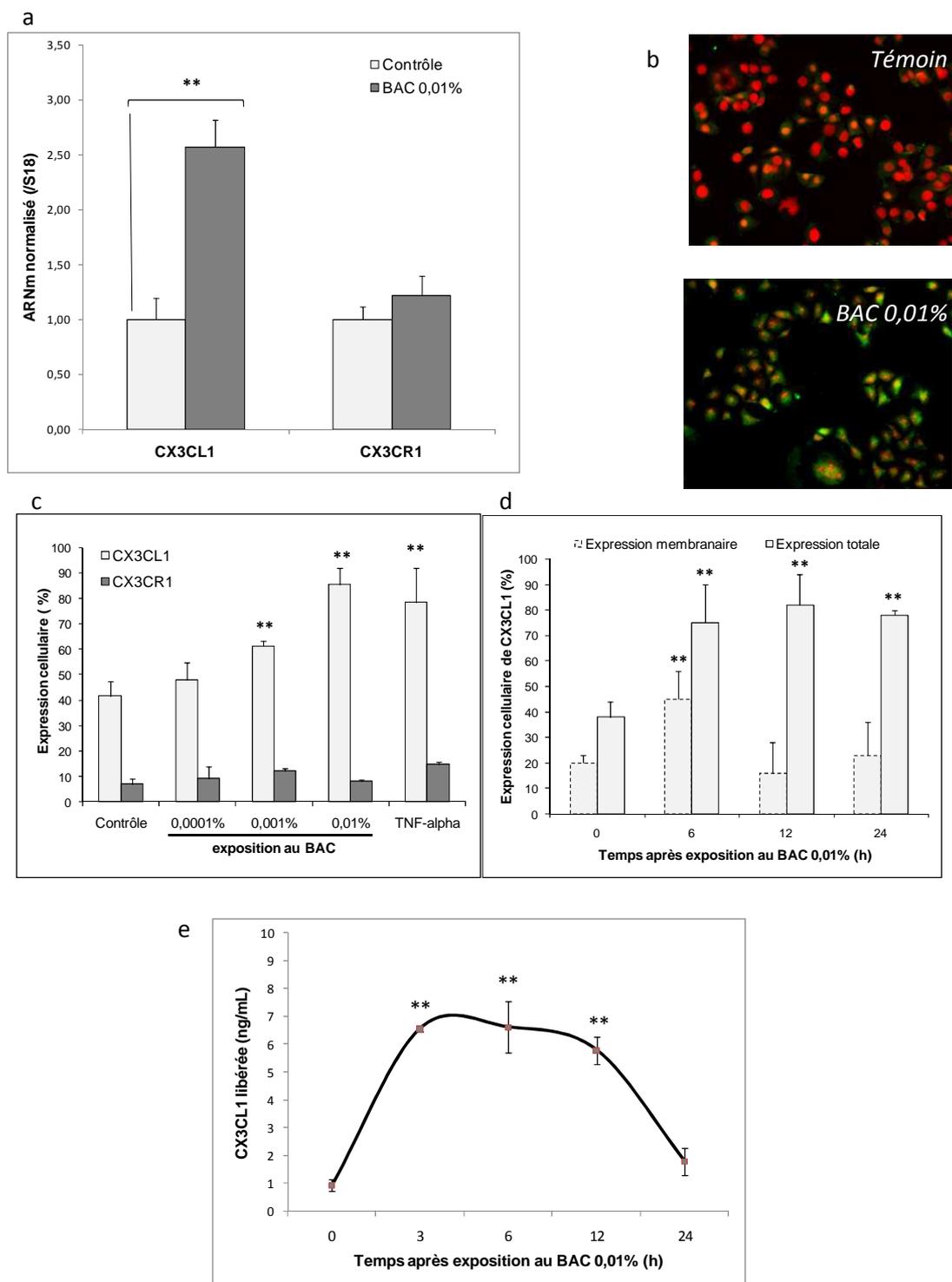


Figure 24 : Induction de l'expression de CX3CL1 sur une lignée de cellules épithéliales conjonctivales (IOBA-NHC) en réponse au BAC. (a) Une stimulation par BAC 0,01 % entraîne une augmentation de la synthèse d'ARNm de CX3CL1 et pas de CX3CR1. *t-test*, ** : $P < 0,01$. (b) L'induction de CX3CL1 est détectée par immunofluorescence indirecte (vert) en microscopie optique ($\times 100$). (c) Le BAC induit une surexpression de CX3CL1 de manière dose-dépendante comme détecté en CMF. (d) La localisation cellulaire de CX3CL1 en fonction du temps est détaillée en CMF. (e) L'exposition au BAC entraîne une libération rapide de CX3CL1 détectée par ELISA dans le milieu extracellulaire et exprimée pour 10000 cellules/ml. ANOVA, ** : $P < 0,01$.

L'induction de synthèse de CX3CL1 par le BAC est médiée par le TNF- α . Une stimulation par le TNF- α (10ng/ml) seul entraîne une surexpression de CX3CL1. Au contraire, l'antagonisme du récepteur TNF-R1 par un anticorps bloquant (1 :50, MAB225, R&D Systems) inhibe la synthèse de CX3CL1 induite par le BAC (**Figure 25**).

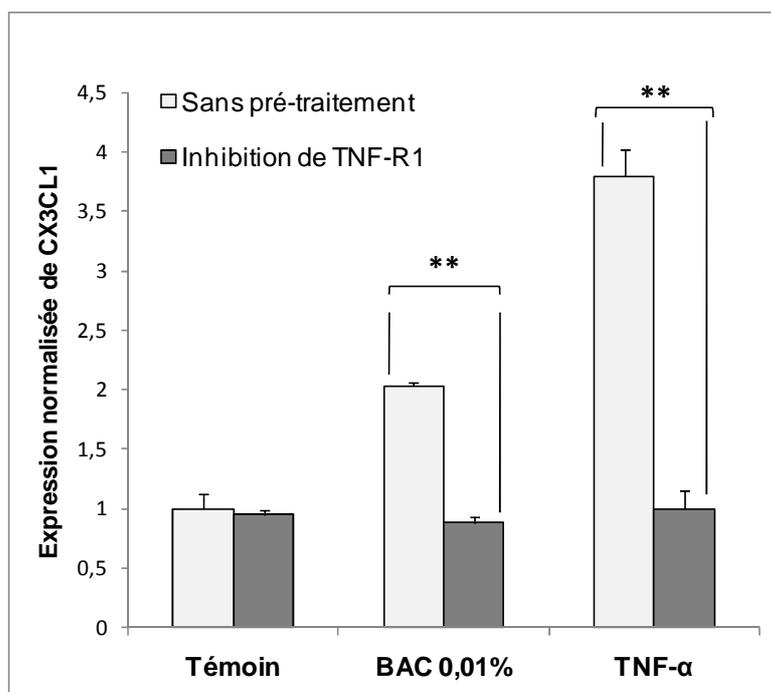


Figure 25 : Implication du système TNF- α / TNF-R1 dans la surexpression de CX3CL1 induite par le BAC. La pré-incubation des cellules épithéliales conjonctivales avec un anticorps neutralisant du récepteur TNF-R1 inhibe la surexpression de CX3CL1 induite par le BAC. ANOVA, ** : $P < 0,01$.

2.4.3 Effet chimiotactique in vitro des cellules épithéliales conjonctivales via CX3CL1/CX3CR1

Les cellules épithéliales conjonctivales attirent certaines populations leucocytaires par l'intermédiaire de la synthèse de CX3CL1. Nous avons évalué le rôle du système CX3CL1/CX3CR1 dans les interactions entre cellules épithéliales conjonctivales et leucocytes humains non-adhérents en culture primaire dans des chambres de migration. Les

cellules épithéliales conjonctivales non stimulées ne présentent pas de propriétés chimiotactiques sur les leucocytes extraits CD45+. En revanche, les leucocytes migrent significativement vers des cellules épithéliales conjonctivales préalablement stimulées par du BAC (0,01%, 12 heures avant) (**Figure 26a**). L'analyse des sous-populations en CMF montre une migration spécifique de lymphocytes (CD3+/CD56-), de NKs (CD3+/CD56+) et de monocytes (CD14+). La préincubation des leucocytes avec un anticorps bloquant anti-CX3CR1 réduit significativement la migration des NKs et des monocytes, mais pas celle des autres lymphocytes. En parallèle, l'étude de la migration de macrophages humains adhérents CD14+ en culture primaire confirme l'effet chimioattractant de la chimiokine CX3CL1 synthétisée par les cellules épithéliales conjonctivales en présence de BAC (**Figure 26b**). Cet effet est diminué de moitié en cas de blocage du récepteur CX3CR1.

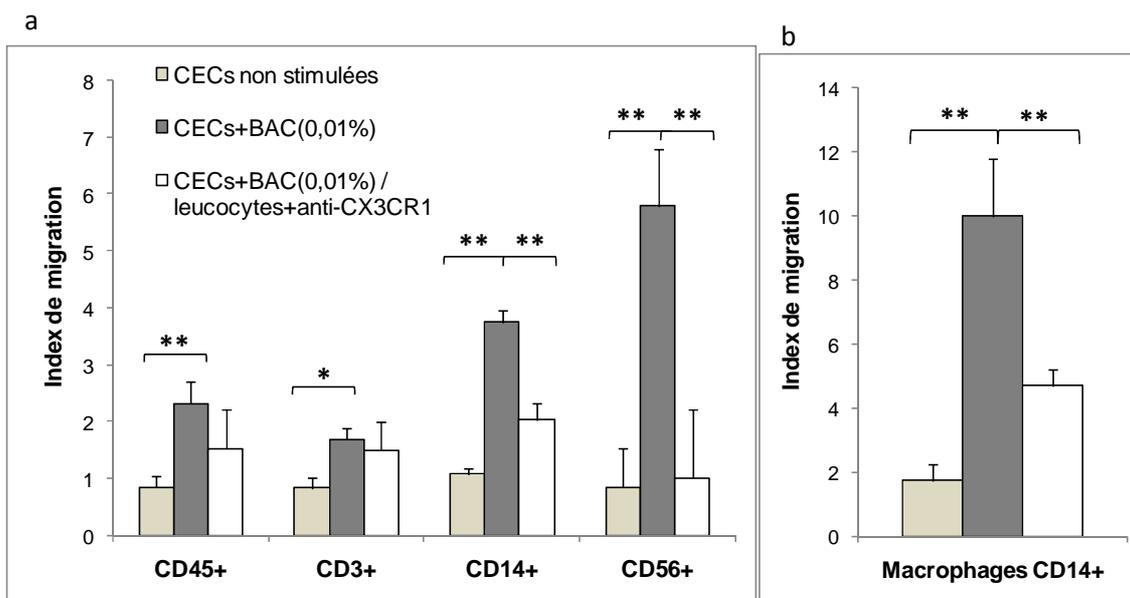


Figure 26 : Migration des leucocytes *in vitro* en réponse à des cellules épithéliales conjonctivales stimulées par BAC. (a) Migration des leucocytes non-adhérents en culture primaire. Les cellules épithéliales conjonctivales non-stimulées n'ont pas d'effet attractant. Les cellules épithéliales conjonctivales stimulées par du BAC attirent significativement les populations leucocytaires dont le phénotype est déterminé par CMF. Le blocage de CX3CR1 par pré-incubation des leucocytes avec un anticorps neutralisant inhibe significativement la migration des monocytes CD14+ et des NKs CD56+. (b) Migration des macrophages adhérents CD14+ en culture primaire. La migration des macrophages vers les cellules épithéliales conjonctivales stimulées est inhibée significativement et partiellement en bloquant CX3CR1. ANOVA, * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$.

2.4.4 Migration conjonctivale des cellules inflammatoires chez la souris KO pour CX3CR1 en réponse au chlorure de benzalkonium

L'infiltration macrophagique des conjonctives exposées au BAC dépend du système CX3CL1/CX3CR1. Nous avons utilisé des souris déficientes pour le récepteur CX3CR1 et leur témoin wild-type afin de compléter nos résultats *in vitro*. Les conjonctives ont été prélevées et analysées en immunohistofluorescence 12 heures après une exposition aiguë au BAC 0,05% selon une procédure précédemment validée (Ichijima 1992, Liang 2008). Pour les yeux non exposés au BAC, la densité conjonctivale de cellules dendritiques (CX3CR1+), de granulocytes (CD11b+), de lymphocytes (CD3+), de NKs (NK2GD+) et de macrophages (F4/80+) est similaire dans les deux lignées. L'exposition au BAC entraîne une infiltration conjonctivale majeure par des cellules CD11b+, CD3+ ou F4/80+ quelle que soit la lignée génétique murine (**Figure 27a**). Dans les yeux exposés au BAC, la densité de cellules CD11b+ ou CD3+ est comparable dans les deux lignées (**Figure 27b**). En revanche, l'infiltration macrophagique F4/80+ est significativement diminuée chez les souris déficientes pour le récepteur CX3CR1 comparativement à leurs témoins CX3CR1^{+/+}, suggérant qu'une infiltration sélective de macrophages en réponse au BAC dépend de CX3CL1.

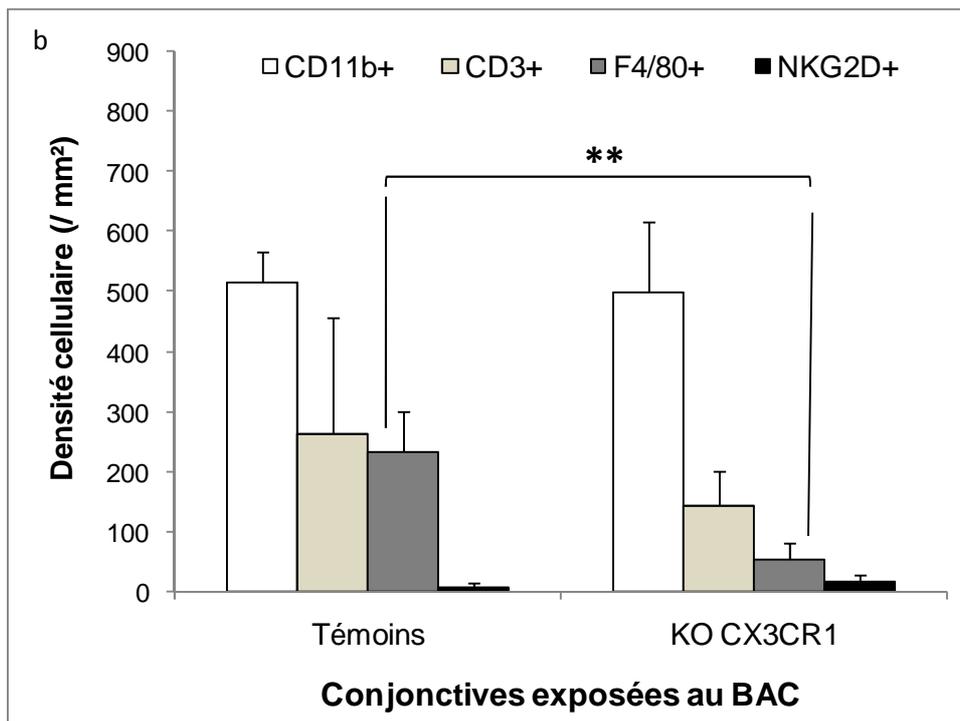
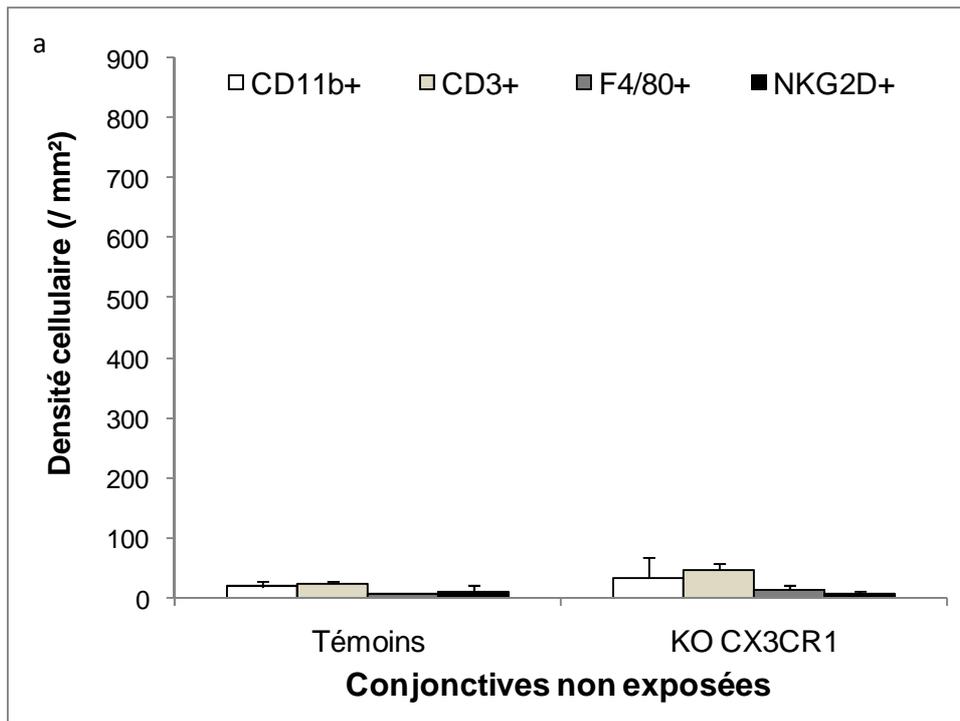


Figure 27 : Infiltration inflammatoire *in vivo* de la conjonctive exposée au BAC sur lignée de souris déficiente pour CX3CR1 évaluée en immunohistofluorescence (n=20). (a) Il existe une très faible infiltration conjonctivale par des cellules inflammatoires en l'absence de stress toxique. Aucune différence n'est notée entre les souris KO et leurs témoins homozygotes +. (b) L'exposition au BAC induit une infiltration inflammatoire conjonctivale. L'infiltration par des macrophages F4/80+ est significativement moindre dans le groupe KO par rapport au groupe témoin. *Mann-Whitney U-test*, ** : $P < 0,01$.

Nos résultats révèlent ainsi que la chimiokine CX3CL1 est impliquée dans le trafic conjonctival de certaines cellules immunitaires en cas d'inflammation iatrogène. Nous montrons de façon originale que les cellules épithéliales présentent une synthèse inductible de CX3CL1 *via* le TNF- α qui régule la migration tissulaire des leucocytes CX3CR1+. Ce système chimiokinergique pourrait ainsi jouer un rôle au cours des pathologies inflammatoires chroniques de la surface oculaire.

Ainsi, nos travaux concernant les deux axes de recherche choisis révèlent que certaines chimiokines sont impliquées dans la physiopathologie du segment antérieur au cours du glaucome. Nos résultats concernant CXCL12 démontrent de façon inédite qu'une chimiokine est directement impliquée dans la régulation du microenvironnement trabéculaire et pourrait ainsi constituer la cible de traitements spécifiques contre le glaucome. Parallèlement, nous démontrons qu'une autre chimiokine, CX3CL1, est impliquée dans l'inflammation conjonctivale iatrogène induite par l'administration de collyres antiglaucomateux avec conservateur. Ces résultats illustrent d'une part la dualité des fonctions -immunitaires et extra-immunitaires- des chimiokines. Ils nous amènent d'autre part à nous interroger sur les relations chimiques et cellulaires éventuelles entre la surface oculaire et le trabéculum anatomiquement très proches. La recherche d'interactions entre ces deux structures *via* les chimiokines étudiées ou d'autres chimiokines permettrait de mieux appréhender ces éléments déterminants de la maladie glaucomateuse. La discussion qui suit ouvre ainsi les perspectives d'une nouvelle approche de la physiopathologie du segment antérieur dans le glaucome.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le GPAO est une neuropathie ophtalmologique fréquente et potentiellement cécitantes fréquemment associée à une élévation anormale de la PIO (*Quigley 2006, Cedrone 2008*). La prise en charge thérapeutique actuelle du GPAO repose essentiellement sur l'utilisation de collyres hypotonisants. Les praticiens recourent à une molécule ou à une association de molécules afin d'atteindre l'objectif pressionnel fixé et de stopper temporairement l'évolution de la maladie. En pratique clinique, une inefficacité progressive des traitements médicaux conduit à combiner deux, trois, voire quatre principes actifs dont l'association ne permet parfois pas de stopper la progression de la neuropathie, échappant alors à tous les traitements connus (*Kass 2002*). De plus, le recours à une multitude de collyres au long cours expose les patients à une inflammation iatrogène chronique de la surface oculaire qui nuit à la tolérance et l'observance thérapeutique, et engendre parfois de réelles pathologies de la surface oculaire aux conséquences visuelles et sociales importantes.

L'HTO est le principal facteur de risque lié à la fois au développement et à la progression du GPAO (*Sommer, 1989*). Elle est secondaire à une résistance anormale du trabéculum à l'écoulement de l'humeur aqueuse (*Tektas 2009*). La trabéculopathie glaucomateuse, *primum movens* de la maladie, associe une raréfaction des cellules trabéculaires à un remodelage de la MEC dont les mécanismes physiopathologiques sont encore mal connus (*Alvarado 1984, Rohen 1984, Grierson 1987, Hamard 2002*). Dans nos travaux, nous démontrons qu'il existe un équilibre physiologique entre la chimiokine CXCL12 et sa forme clivée SDF-1(5-67) qui régit la fonction de filtration du trabéculum en régulant la viabilité des cellules trabéculaires *via* les récepteurs CXCR4 et CXCR3. Nous rapportons que l'utilisation *in vivo* d'un antagoniste non-peptidique spécifique de CXCR3 permet de diminuer significativement la PIO dans un modèle animal d'HTO, proposant ainsi une nouvelle piste thérapeutique antiglaucomateuse ciblée sur un récepteur aux chimiokines.

La chimiokine CXCL12 est impliquée notamment dans le contrôle de l'homéostasie tissulaire ainsi que la régulation de la MEC (*Rostene 2007, Li 2008, Lapidot 2005, Son 2006*). Les phénomènes pathologiques observés dans les trabéculums de patients atteints de GPAO nous ont conduits à formuler l'hypothèse selon laquelle CXCL12 pourrait être impliqué dans la trabéculopathie glaucomateuse. Dans ce travail de thèse nous avons ainsi initialement détecté

la présence de CXCL12, CXCR3 et CXCR4 au sein de trabéculums glaucomateux prélevés ainsi que dans une lignée humaine de cellules trabéculaires glaucomateuses. Notons que pour des raisons évidentes il n'est pas aujourd'hui possible d'obtenir des trabéculums frais de patients sains, ce qui interdit *in vivo* toute comparaison trabéculaire chez l'homme. Les ARNm de CXCL12 ont été précédemment détectés dans des cellules trabéculaires par microarrays (Zhao 2004) sans étude spécifique ni de la protéine ni de la fonction; CXCR4 a déjà étudié dans la cornée et la rétine, au sein desquels il pourrait être impliqué dans la néoangiogénèse et la migration lymphocytaire (Crane 2000, Bourcier 2003, Bhutto 2006), mais aucune étude n'a été réalisée dans le trabéculum; CXCR3 n'a pas été analysé dans l'œil. Depuis une dizaine d'années, des antagonistes non-peptidiques spécifiques de certains GPCRs ont été développés et testés dans plusieurs pathologies extraoculaires (Donzela 1998, Bertolini 2002, Walzer 2006, Cashen 2008). Nous avons utilisé des antagonistes de CXCR3 (NBI74330) et de CXCR4 (AMD3100) dans un modèle expérimental d'HTO afin d'évaluer *in vivo* l'éventuel rôle de ces récepteurs dans la physiopathologie glaucomateuse. Le modèle d'HTO produit par cautérisation des veines épisclérales a permis d'obtenir une HTO stable sur plusieurs mois (Garcia-Valenzuela 1995, Danias 2006, Urcola 2006, Yu 2006, Park 2008). L'administration de NBI74330 par voie sous-conjonctivale a entraîné une diminution significative de l'HTO dans les yeux opérés, de façon dose-dépendante, jusqu'au niveau pressionnel physiologique des yeux témoins. Le NBI74330 est un antagoniste spécifique et puissant de CXCR3 dont la pharmacologie a été détaillée chez l'homme et les rongeurs (Medina 2004, Heise 2005, Jopling 2007, Verzijl 2008). Chez l'animal, son utilisation expérimentale a permis de diminuer la formation des plaques d'athérosclérose (van Wanrooij 2008). Nous rapportons ici de façon originale que le NBI74330 permet de diminuer la PIO dans un modèle d'HTO.

L'évaluation *in vivo* de la filtration de l'humeur aqueuse dans notre modèle a permis de mieux comprendre les phénomènes impliqués dans l'induction chirurgicale de l'HTO ainsi que les mécanismes responsables de l'effet hypotonisant de l'antagonisme de CXCR3. Comme décrit précédemment, ce modèle de cautérisation des veines épisclérales partage de nombreuses similarités avec le GPAO humain : il permet d'obtenir une HTO stable au long cours, ne fait pas intervenir de procédures altérant directement le trabéculum –comme le LASER, l'injection de billes obturantes, ou l'injection de sérum salé hypertonique-, n'entraîne pas de variations morphologiques de la chambre antérieure ou de l'angle irido-cornéen (Nissirios 2008), et conduit au développement d'une neuropathie par dégénérescence des RGCs (Yu

2006). Comme cela a été détaillé dans l'introduction de cette thèse, il n'existe cependant pas de modèle de GPAO validé compte-tenu du fait que les mécanismes physiopathologiques impliqués demeurent inconnus. Nous rapportons que la cautérisation des veines épisclérales entraîne au long cours une diminution du renouvellement de l'humeur aqueuse par obstruction à l'écoulement au niveau du trabéculum, ainsi qu'une apoptose des CTs. Nous formulons ici l'hypothèse selon laquelle l'HTO initialement induite par le blocage mécanique des voies veineuses chargées de la réabsorption de l'humeur aqueuse fait place progressivement à une véritable trabéculopathie responsable de l'HTO au long cours. Dans ce modèle, le traitement par injections sous-conjonctivales de NBI74330 a permis non seulement de restaurer la fonction trabéculaire en augmentant la filtration de l'humeur aqueuse, mais aussi de diminuer l'apoptose trabéculaire observée ainsi que l'apoptose des cellules ganglionnaires rétinienne. Comme nous l'avons souligné dans l'introduction, le modèle utilisé ici nous semble être le plus proche de la maladie glaucomateuse humaine. Néanmoins, le test des antagonistes sur d'autres modèles animaux cités précédemment pourrait ou non conforter nos résultats.

Il a été récemment rapporté que le clivage de CXCL12 par certaines MMPs génère une chimiokine tronquée, SDF-1(5-67), dont les propriétés pro-apoptotiques étaient médiées par CXCR3 (Zhang 2003, Vergote 2006). Dans les CTs, nous avons détecté SDF-1(5-67) en utilisant un anticorps spécifique du néo-épitope de cette forme tronquée, et avons démontré (i) qu'il provenait de l'activité protéolytique de certaines MMPs produites par les CTs, et (ii) que sa production était augmentée par le TNF- α et le TGF- β 2, deux cytokines impliquées dans le GPAO. Il est ainsi intéressant d'observer que l'accélération du clivage de CXCL12 synthétisé par les CTs en (5-67) est conditionnée *in vitro* par certaines MMPs (Alexander 2001, Hosseini 2006, Acott 2008) et certaines cytokines comme le TNF- α et le TGF- β 2 (Tripathi 1994, Sawada 2010) connues comme étant surexprimées au cours de la maladie glaucomateuse.

Sur une lignée humaine de cellules trabéculaires, nous rapportons une fonction constitutive autocrine de CXCL12, comme précédemment décrit dans le SNC (Pujol 2005). Ainsi des concentrations physiologiques de CXCL12 protègent les cellules trabéculaires d'une apoptose induite par le BAC, de façon dose-dépendante, en activant CXCR4 et mobilisant le calcium intracellulaire. Ce rôle protecteur de CXCL12/CXCR4 a été rapporté dans des cultures primaires de neurones et dans des cultures de cellules méningiomateuses (Barbieri 2006, Khan 2008). Le blocage spécifique de CXCR4 par l'AMD3100 inhibe totalement l'effet de CXCL12. De plus, nous n'avons détecté qu'une très faible quantité de CXCR7, l'autre récepteur potentiel de CXCL12, et l'absence d'influence de CXCL12 ou CXCL11 sur

l'expression trabéculaire de ce dernier, confirmant que la fonction protectrice de CXCL12 dépendait uniquement de CXCR4.

En parallèle, l'utilisation de SDF-1(5-67) sur notre modèle d'apoptose trabéculaire induite par le BAC entraîne une augmentation de l'apoptose des CTs, de façon dose-dépendante, associée à une augmentation de l'activation de la caspase-3. Le blocage spécifique de CXCR3 par le NBI74330 inhibe totalement cet effet pro-apoptotique, alors que l'utilisation d'un ligand connu de CXCR3 (CXCL10) mime l'effet délétère du SDF-1(5-67). De façon concordante, il a été précédemment publié que CXCL10 induisait une apoptose *via* CXCR3 et l'activation de la caspase-3 dans les cellules endothéliales et les neurones (Romagnani 2001, Yang 2004, Sui 2006). Notons de plus que SDF-1(5-67) et CXCL10 présentent des similitudes structurales au niveau du domaine impliqué dans la liaison avec CXCR3 (Booth 2002).

Au vu de ces résultats sur tissus humains, sur cultures cellulaires, et dans un modèle animal d'HTO, nous suggérons que la chimiokine CXCL12 joue un rôle fondamental dans la physiopathologie trabéculaire. Au cours du glaucome, la fonction protectrice autocrine de CXCL12 garantissant l'homéostasie du trabéculum pourrait être déséquilibrée par la protéolyse de CXCL12 induite par une surexpression pathologique de certaines cytokines et MMPs impliquées dans le GPAO. La bascule de la balance CXCL12/SDF-1(5-67) en faveur de la forme clivée pourrait alors entraîner une apoptose *via* CXCR3, altérant la fonction de filtration trabéculaire responsable de l'élévation de la PIO. Ainsi, cette dégradation trabéculaire morphofonctionnelle pourrait être préservée par l'utilisation d'un antagoniste spécifique de CXCR3 administré par voie locale. Ces résultats mettent en avant le rôle d'un système chimiokinergique dans l'homéostasie trabéculaire, d'autres chimiokines pouvant aussi être impliquées, notamment CXCL2, IL8 et CXCL6 récemment détectées dans le trabéculum (Shifera 2010). L'utilisation ophtalmologique d'antagonistes spécifiques de certains GPCRs comme CXCR3 pourrait ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques contre la trabéculopathie, leurs mécanismes d'action s'avérant totalement différents de ceux des traitements antiglaucomeux actuels. Ces résultats révèlent ainsi une cible inédite dont les perspectives thérapeutiques seront envisagées en troisième partie de la discussion.

Parallèlement à l'analyse des mécanismes physiopathologiques intervenant dans l'HTO et la trabéculopathie glaucomateuse, nous avons étudié l'implication des chimiokines au cours des phénomènes d'inflammation de la surface oculaire liés aux traitements antiglaucomateux actuels. Ayant initialement mis en évidence une synthèse accrue de CX3CL1 par les cellules épithéliales conjonctivales des patients exposés à un traitement contenant du BAC, nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle cette chimiokine pourrait être impliquée dans les phénomènes inflammatoires induits par le BAC. La chimiokine CX3CL1 est impliquée dans le trafic de certaines populations leucocytaires comme les macrophages, les lymphocytes cytotoxiques et les NKs exprimant le récepteur CX3CR1 (*Bazan 1997, Imai 1997, Chapman 2001, Garton 2001, Goda 2000*). Initialement détectée au sein de l'endothélium vasculaire, l'expression de CX3CL1 a été mise en évidence au sein de populations cellulaires épithéliales ou dérivées des fibroblastes au cours de pathologies allergiques ou dysimmunes comme la dermatite atopique, le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde et le syndrome de Gougerot-Sjögren (*Raychaudhuri 2001, Echigo 2004, Ruth 2004, Wildenberg 2008*). Nos travaux démontrent de façon originale que la synthèse de CX3CL1 par les cellules épithéliales conjonctivales est impliquée dans les processus inflammatoires de la conjonctive. Ainsi, l'exposition au BAC, un des premiers conservateurs utilisés dans la pharmacopée ophtalmologique, entraîne une infiltration de cellules monocytaires et macrophagiques par l'induction directe d'une synthèse épithéliale de CX3CL1. Par le biais de la mise en évidence de propriétés proinflammatoires directes d'un tel composé, nous démontrons le rôle privilégié de CX3CL1 dans l'immunité de la surface oculaire.

Nous avons tout d'abord mis en évidence une synthèse basale de CX3CL1 par les cellules conjonctivales de patients sains grâce à la technique des empreintes conjonctivales couplée à une immuno-détection par cytométrie en flux. Une telle expression épithéliale a été rapportée dans le tractus digestif et la peau, mais jamais étudiée au sein de la conjonctive. De récents travaux sur la cornée ont en revanche mis en évidence que le récepteur CX3CR1 était impliqué dans le homing et le renouvellement de certaines cellules monocytaires comme les cellules dendritiques au sein du stroma cornéen (*Chinerry 2007, Kezic 2008*). Nous pouvons ainsi formuler l'hypothèse selon laquelle la synthèse conjonctivale de CX3CL1 pourrait intervenir dans la régulation physiologique du trafic de certaines cellules de l'immunité.

Les empreintes conjonctivales associées à la CMF constituent une méthode non invasive d'analyse quantitative de certains marqueurs cellulaires exprimés au niveau de la surface oculaire. Notre équipe avait développé cette technique et identifié certains marqueurs

inflammatoires d'intérêt au cours de l'allergie, la sécheresse oculaire et l'inflammation induite par les conservateurs (Baudouin 2005). Il a ainsi été rapporté que l'exposition au BAC induisait une surexpression de protéines membranaires de l'inflammation comme HLA-DRII et ICAM-1, d'IL-8, et des récepteurs aux chimiokines CCR4 et CCR5 (Baudouin 2004, Brignole 1998, Pisella 2004, Baudouin 2005), soulignant ainsi la complexité des voies de l'inflammation mises en jeu. Nos travaux révèlent une surexpression épithéliale de CX3CL1 chez des patients glaucomateux exposés au BAC comparativement à une population bénéficiant d'un traitement sans conservateur. L'expression de CX3CL1 est corrélée d'une part à celle de HLA-DRII, d'autre part au score d'atteinte clinique de la surface oculaire. CX3CL1 pourrait ainsi constituer un nouveau marqueur spécifique d'inflammation de la surface oculaire.

Nous avons aussi testé les effets chimiotactiques de la synthèse épithéliale de CX3CL1 *in vitro* sur une lignée humaine de cellules épithéliales conjonctivales exposées au BAC. Nous avons précédemment développé ce modèle de toxicité *in vitro* et rapporté l'effet proapoptotique du BAC (Brasnu 2008). Les présents travaux démontrent que l'exposition des cellules épithéliales conjonctivales au BAC induit une surexpression significative de CX3CL1 de façon dose- et temps-dépendante. Récemment, une analyse des cytokines exprimées dans un modèle cellulaire de toxicité comparable a révélé que la synthèse de TNF- α , l'IL-1, l'IL-10 et l'IL-12 était induite par le BAC (Epstein 2009). La chimiokine CX3CL1 a la particularité de présenter une forme transmembranaire et une forme soluble. Notre étude rapporte que les cellules épithéliales conjonctivales exposées au BAC relarguent massivement CX3CL1 dans le milieu de culture. Nos expériences de migration cellulaire mettent en évidence que cette synthèse de CX3CL1 est responsable d'une attraction de certaines populations leucocytaires, notamment des lymphocytes CD3+, des cellules monocytaires CD14+ et des NKs CD56+. Il est aujourd'hui connu que ces types cellulaires expriment le récepteur CX3CR1 (Bazan 1997, Imai 1997, Chapman 2001, Garton 2001, Goda 2000). Nos travaux confirment que le blocage de CX3CR1 inhibe le pouvoir migratoire des cellules épithéliales conjonctivales stimulées par le BAC de façon partielle ou totale selon le phénotype cellulaire, soulignant ainsi la complexité des interactions cellulaires impliquées. D'autres systèmes de chimiokines comme CCL2, CCL4, ou CCL5 pourraient aussi participer à l'infiltration inflammatoire de la conjonctive.

La mise au point récente de souris transgéniques KO pour CXCR3 avec ou sans insertion du gène codant pour la GFP a permis de mieux appréhender les effets *in vivo* du système

CX3CL1/CX3CR1 notamment dans le renouvellement cornéen des cellules de l'immunité (Chinnery 2007, Jung 2000, Kezic 2008). L'observation de notre modèle murin CX3CR1^{gfp/gfp} a révélé que cette perte de fonction n'influait pas la distribution des cellules CD45⁺ ni des dendritiques résidentes CX3CR1⁺ au sein de la conjonctive saine. Une étude précédente portant sur la rétine, l'iris et les corps ciliaires est parvenue au même résultat (Kezic 2008). En revanche, une récente étude de Chinnery *et al* a rapporté que la distribution des cellules dendritiques résidentes au sein de la cornée dépendait de CX3CR1 (Chinnery 2008). Cette disparité cornéo-conjonctivale pourrait trouver une explication dans les différences histologiques que présentent ces tissus et particulièrement l'absence de vascularisation de la cornée qui conditionne considérablement le trafic cellulaire en son sein. Dans notre modèle animal d'exposition au BAC, nous retrouvons une infiltration inflammatoire CD 45⁺ significative des conjonctives exposées comme précédemment rapporté (Becquet 1998, Kahook 2008, Noecker 2004, Sherwood 1998). En revanche, l'absence de fonctionnalité du récepteur CX3CR1 conduit à une diminution de l'infiltration par les cellules macrophagiques CD45⁺ F4/80⁺, alors que les autres populations leucocytaires ne sont pas affectées. Une étude récente sur un modèle murin de brûlure cornéenne par base rapporte des résultats similaires au sein de la cornée de souris KO pour le récepteur CX3CR1 (Lu 2008). Cette étude souligne en outre la coexistence de deux populations monocytaires, CD16⁺/CCR2⁻/CX3CR1⁺ et CD16⁻/CCR2⁺/CX3CR1⁻, dont les propriétés migratoires dépendent du profil d'expression de ces récepteurs (Geissmann 2003, Lu 2009). Nos travaux retrouvent ainsi que l'absence de CX3CR1 réduit partiellement l'infiltration monocytaire induite par le BAC, suggérant l'implication d'autres systèmes, notamment CCL2/CCR2. L'étude des conséquences de l'infiltration ou non de la conjonctive par ces macrophages CX3CR1⁺ permettrait de mieux comprendre le rôle de cette régulation de migration. Nous tentons aujourd'hui d'étudier le profil cytokinique conjonctival chez les souris exposées au BAC, notamment la présence d'IL-6, IL-10, MIP-2 et CCL2, mais la fragilité de certaines de ces protéines ainsi que le très faible volume de tissu conjonctival chez la souris en compliquent l'analyse. De plus, il apparaît compliqué d'étudier les conséquences cytotoxiques de cette infiltration macrophagique, comme la libération d'espèces réactives de l'oxygène ou l'apoptose cellulaire, car les effets du BAC, qui induit directement de tels phénomènes, semblent difficiles à différencier de ceux de l'infiltration macrophagique. Notons cependant qu'une étude de toxicité chronique chez les souris KO et témoins, nécessitant l'exposition à de faibles doses quotidiennes de BAC sur plusieurs mois, compléterait de façon pertinente nos travaux.

En dépit d'études cliniques et fondamentales soulignant les effets iatrogènes des conservateurs, le BAC est encore aujourd'hui utilisé dans de nombreux collyres. Dans le glaucome, l'administration au long cours de traitements contenant des conservateurs entraîne une atteinte chronique de la surface oculaire responsable d'authentiques syndromes secs iatrogènes et d'une intolérance au traitement qui nuit à l'efficacité thérapeutique. Notre étude rapporte que le BAC induit une inflammation de la surface oculaire par un effet proinflammatoire direct sur les cellules épithéliales conjonctivales. Par l'intermédiaire des propriétés toxiques d'un tel composé, nous démontrons de façon originale que les cellules épithéliales conjonctivales jouent un rôle clé dans les processus inflammatoires de la conjonctive en influençant directement la migration macrophagique *via* un système chimiokine/récepteur.

En focalisant sur une problématique thérapeutique spécifique de la pathologie glaucomateuse, nos études reflètent cependant la complexité générale des modes d'action chimiokinergiques et notamment la dualité de leurs fonctions, immunitaires d'une part et homéostatiques d'autre part. Initialement étudiées en immunologie, les chimiokines ont peu à peu révélé d'autres fonctions et apparaissent aujourd'hui comme un système fondamental de communication intercellulaire indispensable au développement et à l'équilibre d'un organisme sain (*Callewaere 2007*), mais aussi largement impliqué dans de multiples pathologies.

La redondance des systèmes chimiokine/récepteur semble garantir une certaine stabilité de communication intercellulaire mais rend complexe l'étude de tels systèmes. La découverte récente que la protéolyse de CXCL12 non seulement régule son activité autocrine protectrice mais aussi lui confère des propriétés pro-apoptotiques en promulguant une néo affinité pour un autre récepteur ajoute un niveau de complexité supplémentaire. Ainsi, si CXCL12 contrôle l'homéostasie tissulaire et la composition de la MEC, la MEC elle-même régule l'activité de CXCL12. L'étude des relations entre CXCL12 et les GAGs illustre cette interaction réciproque. Les associations chimiokines/GAGs créent des gradients de phase solide dans l'environnement cellulaire immédiat dont les conséquences sont multiples : (i) la stabilité du signal en protégeant la chimiokine des flux liquides mais aussi de la protéolyse, (ii) l'intensification du signal sur les sites d'intérêt en concentrant la chimiokine, et (iii) le renouvellement du signal par la clearance naturelle du compartiment extracellulaire (*Delgado*

2001, Valenzuela-Fernandez 2002, Villalba 2003, de la Luz Sierra 2004, Hoogewerf 1997, McQuibban 2001). Dans la trabéculopathie glaucomateuse, le remodelage pathologique de la MEC pourrait être conditionné par CXCL12 tout en régulant l'équilibre CXCL12/SDF-1(5-67). Il nous reste aujourd'hui à mieux définir les relations réciproques qui déterminent cet équilibre. La mise en évidence d'un excès de chondroïtine sulfate au sein de la MEC du trabéculum glaucomateux pourrait en ce sens influencer la production de SDF1(5-67). Ainsi, dans le GPAO comme dans de nombreuses pathologies, l'étude du rôle des GAGs sur la modulation du signal chimiokinique doit aujourd'hui être approfondie afin de mieux comprendre certains mécanismes physiopathologiques voire de développer de nouvelles voies thérapeutiques qui cibleraient spécifiquement certains composants de la MEC.

Longtemps considéré comme limité à l'extravasation des leucocytes sur les sites de l'inflammation, le rôle du système CX3CL1/CX3CR1 apparaît aujourd'hui s'étendre aux interactions entre cellules épithéliales ou neuronales et cellules immunitaires dans des conditions physiologiques et pathologiques. Puissant chimioattractant des cellules mononuclées, CX3CL1 semble réguler les mouvements de certaines populations monocytaires –macrophages et cellules dendritiques dans les tissus ou microglies dans le SNC- dont les fonctions sur la viabilité cellulaire ou la modulation des signaux intercellulaire demeurent encore à explorer. Il est intéressant de noter que certains auteurs ont mis en évidence l'existence de populations monocytaires différenciables selon leur profil d'expression de certains récepteurs des chimiokines, notamment CX3CR1 et CCR2 (Lu 2008, Geissmann 2003). Ces monocytes se comportent de façon différente, certains assurant plutôt l'homéostasie tissulaire naturelle, d'autres amplifiant certaines réactions inflammatoires pathologiques. Ainsi le profil d'expression des GPCRs apparaît progressivement comme un nouveau moyen d'étude et de classification des cellules de l'immunité, reflétant mieux leur spécificité fonctionnelle que les classiques marqueurs immunologiques. Une étude récente a montré que la concentration lacrymale de CX3CL1 était élevée en cas de sécheresse oculaire chronique (Enriquez-de-Salamanca 2010). On pourrait ainsi penser que la synthèse lacrymale de CX3CL1 interviendrait dans le recrutement leucocytaire vers la surface oculaire, participant ainsi à la régulation positive ou négative des phénomènes inflammatoires impliqués dans cette affection. Ensemble, ces résultats confirment la place de cette chimiokine au sein de l'immuno-pathologie de la surface oculaire. Le développement d'antagonistes spécifiques de CX3CR1 permettra d'envisager de nouvelles stratégies d'immunomodulation locale.

Le développement récent d'antagonistes non-peptidiques spécifiques des récepteurs aux chimiokines, initialement encouragé par la recherche de nouveaux traitements contre le VIH, a ouvert la voie à de nombreux traitements qui apparaissaient alors prometteurs. Même si certains sont parvenus jusqu'en phase II voire III, il faut avouer que les espoirs de thérapie anti-GPCR se sont heurtés à certains obstacles majeurs. Dans certains cas, la redondance des systèmes chimiokine/récepteur diminue voire annule les effets d'un antagonisme trop ciblé. Par exemple, les essais cliniques de traitement anti-CX3CR1 se sont avérés peu efficaces contre la polyarthrite rhumatoïde ou le psoriasis. Dans d'autres cas, l'inhibition systémique totale d'un axe essentiel –comme ce fut le cas pour CXCR4- induit des effets collatéraux délétères supérieurs aux bénéfices escomptés. Notons d'ailleurs que les modèles animaux KO pour CXCR4 ne sont pas viables, prouvant ainsi le caractère structurant fondamental de ce système chimiokinergique. Enfin, la complexité des fonctions des chimiokines au cours des processus pathologiques nécessite parfois en termes thérapeutiques une inhibition du signal, et parfois une intensification du signal. Par exemple, l'inhibition de CXCR4 réduit la prolifération et la dissémination de certaines cellules cancéreuses, alors que l'inhibition de CX3CR1 entraîne une accumulation des microglies cytotoxiques au sein du SNC ou de la rétine. On peut ici noter que l'inactivation du signal CX3CR1 peut être liée à la présence de variants du récepteur qui conditionnent sa fonction, comme cela a été suggéré dans l'athérosclérose et la DMLA (*Combadiere 2003, Combadiere 2007, Raoul 2008, McDermott 2007*). Ainsi le polymorphisme d'expression des GPCRs pourrait permettre de caractériser certaines populations cellulaires –apparaissant comme de nouveaux marqueurs biologiques- mais aussi de définir certaines prédispositions pathologiques –constituant alors des marqueurs pronostiques.

Pour mettre en perspective nos travaux, notons que le système chimiokinergique constitue aujourd'hui le premier acteur de la communication cellulaire autocrine et paracrine dans le microenvironnement immédiat. Il apparaît ainsi comme la cible thérapeutique privilégiée dans de nombreuses pathologies. Comme nous l'avons précédemment évoqué, les stratégies thérapeutiques ciblant les récepteurs couplés aux protéines G ont souvent connues des échecs cliniques liés à leurs effets secondaires, ce qui confirme le rôle fondamental de ce système dans le maintien des fonctions physiologiques de l'organisme. Le retrait récent du

rimonabant, un antagoniste du récepteur CB1 indiqué dans le traitement de l'obésité et le sevrage nicotinique, lié à ses effets neurotropes déprimeurs délétères en est une récente illustration (*FDA 2009*). En ophtalmologie, le recours à la voie locale constitue un avantage fondamental car il permet de s'affranchir des effets généraux des agonistes/antagonistes des systèmes chimiokines/récepteurs. La découverte que l'utilisation locale d'un antagoniste d'un récepteur des chimiokines permet de diminuer l'HTO dans un modèle animal de glaucome, comme montré dans le premier article de cette thèse, ouvre ainsi des perspectives de traitement inédites.

La poursuite de nos travaux sur la trabéculopathie glaucomateuse nécessite d'une part de tester d'autres antagonistes sélectifs des récepteurs CXCR3 et CXCR4, mais aussi des antagonistes sélectifs d'autres récepteurs aux chimiokines, notamment CX3CR1, CCR2 et CCR8, *in vitro* et dans notre modèle animal de glaucome. Concernant les effets trabéculaires de CXCL12, l'étude des interrelations entre la chimiokine CXCL12 et les glycosaminoglycanes de la MEC trabéculaire pourrait de façon pertinente compléter notre modèle physiopathologique comme détaillé précédemment. Nous pourrions par exemple imaginer que l'inversion du rapport héparane/chondroïtine sulfates en faveur des chondroïtine sulfates au cours du glaucome pourrait impacter l'efficacité comme la stabilité de CXCL12. Il semble en outre nécessaire de mieux étudier les phénomènes de changement morphologique et de migration cellulaires liés à l'exposition des cellules trabéculaires au CXCL12 et/ou au SDF-1(5-67). D'autre part, il apparaît nécessaire de compléter l'étude des conséquences neuro-rétiniennes de la diminution de la PIO induite par les antagonistes de CXCR3 à plus long terme. L'étude de l'apoptose des cellules ganglionnaires rétiniennes, de l'atrophie rétinienne, et des éventuelles modifications microgliales induites permettra de compléter l'analyse de notre approche thérapeutique ciblée. Enfin, si nos hypothèses se vérifient, l'industrie pharmaceutique en ophtalmologie devra développer une forme galénique topique adaptée à la thérapeutique oculaire humaine.

Nos travaux sur l'inflammation iatrogène de la surface oculaire révèlent que la synthèse épithéliale d'une chimiokine comme CX3CL1 est impliquée dans le trafic conjonctival des cellules immunitaires. Il reste cependant à déterminer les conséquences histologiques et cellulaires des modulations de ce trafic. Nos résultats ouvrent des perspectives d'étude de CX3CL1 dans les troubles chroniques de la surface oculaire, particulièrement dans la sécheresse oculaire primitive dont les traitements actuels semblent insuffisants en pratique clinique. Comme cela a été évoqué précédemment, la sécheresse oculaire est une pathologie

multifactorielle régie par des phénomènes inflammatoires locaux complexes. Il semble évident que CX3CL1 n'est pas la seule chimiokine impliquée dans la migration des leucocytes vers la conjonctive, et d'autres systèmes devront être recherchés et étudiés. Ainsi, la mise en évidence du rôle spécifique de certaines chimiokines pourrait permettre de mieux appréhender et traiter la sécheresse oculaire en ciblant spécifiquement les axes impliqués.

Pour conclure, la proximité anatomique de la conjonctive, en surface, et du trabéculum, en profondeur, nous amène naturellement à la question de l'interdépendance de ces deux entités oculaires apparemment distinctes. Nous pourrions formuler l'hypothèse d'une communication intercellulaire entre ces deux tissus par l'intermédiaire des chimiokines. Ainsi, certaines chimiokines synthétisées par la conjonctive pourraient directement ou indirectement affecter le trabéculum. L'impact délétère des collyres sur la surface oculaire aurait-il par ce biais des conséquences inattendues sur l'évolution de la maladie glaucomateuse, et dans la physiopathologie du segment antérieur en général ?

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

1 BREVET

Method and Pharmaceutical composition for use in the treatment of glaucoma

Numéro :WO10305693

Date de dépôt :28 Juin 2010

<u>CO-INVENTEURS</u>	<u>INSTITUTION</u>	<u>PART</u>
Alexandre Denoyer	UMRS968, INSERM UPMC, Institut de la Vision, équipe 8	35 %
William Rostène	UMRS968, INSERM UPMC, Institut de la Vision, équipe 8	35 %
Christophe Baudouin	UMRS968, INSERM UPMC, Institut de la Vision, équipe 8	20 %
David Godefroy	UMRS968, INSERM UPMC, Institut de la Vision, Plate- forme imagerie	10 %

Method and pharmaceutical composition for use in the treatment of glaucoma**FIELD OF THE INVENTION**

The invention relates to a compound which is an antagonist of CXCR3 or an inhibitor
5 of the CXCR3 receptor expression for use in the treatment of glaucoma.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Glaucoma is one of the most frequent ocular diseases which prevalence averages about
2% which is increasing with the aging of the population. Despite of the wide advances in the
10 medical and surgical managements of glaucoma, it still leads to clinical blindness in 1% to
30% of the patients, depending on the racial group and the country. So, there is a permanent
need in the art for new molecules for the treatment of glaucoma (see for example Cedrone C.
et Al., 2008).

SUMMARY OF THE INVENTION

Trabecular meshwork (TM) is a functional and anatomic ocular entity located at the
angle formed by the cornea and iris, which primary function is to control the intraocular
pressure (IOP) by regulating the aqueous humor (AH) outflow. Abnormal increase in the
trabecular outflow resistance leads to elevated IOP which is the most critical risk factor for
20 glaucoma (see for example Sommer A., 1989) Hence, abnormally elevated IOP during both
angle-closure or primary open-angle glaucoma is linked with glaucomatous neuroretinal
degeneration causing visual impairments to blindness.

Surprisingly, the inventors discovered that the inhibition of CXCR3, induces a
significant decrease in IOP and thereby may lead to the treatment of glaucoma.

25 Thus, a first object of the invention relates to a compound which is an antagonist of
CXCR3 or an inhibitor of the CXCR3 receptor expression for use in the treatment of
glaucoma.

Another object of the invention relates to a pharmaceutical composition for the
treatment of glaucoma comprising a compound according to the invention and a
30 pharmaceutically acceptable carrier.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

CXCR3 is well known. CXCR3 is a G α i protein-coupled receptor in the CXC chemokine receptor family. Other names for CXCR3 are G protein-coupled receptor 9 (GPR9) and CD183. There are two variants of CXCR3: CXCR3-A binds to the CXC chemokines CXCL9 (MIG), CXCL10, and CXCL11 (IP-10, I-TAC) whereas CXCR3-B can also bind to CXCL4 in addition to CXCL9, CXCL10, and CXCL11. CXCR3 is able to regulate leukocyte trafficking. Binding of chemokines to CXCR3 induces various cellular responses, most notably integrin activation, cytoskeletal changes and chemotactic migration. CXCR3-ligand interaction attracts Th1 cells and promotes Th1 cell maturation. CXCR3 is well known. As explained in the article Pease et al, (Pease et al., 2009, Expert Opin. Ther. Patents, 19(1):39-58) there are evidence for a role of CXCR3 in the pathophysiology of autoimmune diseases like psoriasis, transplant rejection and T-cell trafficking to sites of inflammation.

As used herein, the term "treating" or "treatment", denotes reversing, alleviating, inhibiting the progress of, or preventing the disorder or condition to which such term applies, or reversing, alleviating, inhibiting the progress of, or preventing one or more symptoms of the disorder or condition to which such term applies.

Glaucoma may be divided in primary and secondary glaucoma.

Primary glaucoma may be divided in "open angle" and "angle-closure" glaucoma. Apart from both these main kinds of glaucoma, other pathologies can lead to an elevation of IOP, namely secondary glaucomas including post-uveitic glaucoma and steroid-induced glaucoma. So the compound according to the invention may be used to primary or secondary glaucoma.

25

A first object of the invention relates to a compound which is an antagonist of CXCR3 or an inhibitor of the CXCR3 receptor expression for use in the treatment of glaucoma.

In a preferred embodiment, said compound according to the invention is a CXCR3 antagonist.

30

In one embodiment, said CXCR3 antagonist may be a low molecular weight antagonist, e. g. a small organic molecule (natural or not).

The term "small organic molecule" refers to a molecule (natural or not) of a size comparable to those organic molecules generally used in pharmaceuticals. The term excludes biological macromolecules (e. g., proteins, nucleic acids, etc.). Preferred small organic molecules range in size up to about 10000 Da, more preferably up to 5000 Da, more preferably up to 2000 Da and most preferably up to about 1000 Da.

In a particular embodiment, the compound according to the invention is NBI74330 (see for example Jopling LA et Al., 2007), AMG487 (see for example Jiwen Liu, et al., 2009, An-Rong Lia et al., 2008 or Johnson M. et al., 2007), AMG1237845 (see for example Rosenblum JM et al., 2009).

Antagonists of CXCR3 are well known in the state of the art (see for example, Pease J.E. et al, 2009, Expert Opin. Ther. Patents).

In a particular embodiment, the compound according to the invention may be a dihydro-quinazoline analog (see for example Pease J.E. et al, 2009, Expert Opin. Ther. or Liu J et al., 2009) like AMG487 (see for example Jiwen Liu, et al., 2009, An-Rong Lia et al., 2008 or Johnson M. et al., 2007).

In a particular embodiment, the compound according to the invention may be a piperidinyl-urea derivative (see for example Pease J.E. et al, 2009, Expert Opin. Ther.) like a 1-aryl-3-piperidin-4-yl-urea derivative (see for example Allen et Al., 2007) or a 5-(piperidin-4-yl)amino-1,2,4-thiadiazole derivative (see for example Watson et Al., 2007), or a tropanyl derivative (see for example Watson et Al., 2008) or a 2-aminoquinoline substituted piperidines derivative (see for example Knight et Al., 2008).

In a particular embodiment, the compound according to the invention may be a 4-aryl-[1,4]diazepine ethyl ureas derivative (see for example Pease J.E. et al, 2009, Expert Opin. Ther. and Cole AG, et al., 2006).

In a particular embodiment, the compound according to the invention may be a benzimidazole derivative or a 2-iminobenzimidazole (see for example Pease J.E. et al, 2009, Expert Opin. Ther., Hayes ME, Wallace GA, et Al., 2008 and Hayes ME, Breinlinger EC et Al., 2008).

In a particular embodiment, the compound according to the invention may be a benzetimide derivative (see for example Pease J.E. et al, 2009, Expert Opin. Ther. and Bongartz JP et al., 2008).

5

In a particular embodiment, the compound according to the invention may be benzetimide derivative (see for example Pease J.E. et al, 2009, Expert Opin. Ther. and Bongartz JP et al., 2008).

10 In another particular embodiment, the compound according to the invention may be an ergoline derivative (see for example Thoma G. et Al., 2009 or Choudhary MS et Al., 1995 and patent application WO2006128658).

In another particular embodiment, the compound according to the invention may be a
15 heterocyclic substituted piperazine derivative (see for example patent applications WO2006088837 and WO2008008453).

In another particular embodiment, the compound according to the invention may be a
heterocyclic substituted pyridine derivative (see for example patent applications
20 WO2007109238 and WO2006088840).

In another particular embodiment, the compound according to the invention may be a
imidazolium derivative (see for example Verzijl D. Et al., and patent application
WO03101970).

25

In another particular embodiment, the compound according to the invention may be an
imidazole derivative (see for example Du X. et Al, 2008).

In another particular embodiment, the compound according to the invention may be a
30 piperaziny-piperidine derivative (see for example McGuinness BF et Al., 2009).

In another particular embodiment, the compound according to the invention may be a
Camphor sulfonamide derivative (see for example Wang Y et Al., 2009).

In another particular embodiment, the compound according to the invention may be a pyrazinyl substituted piperazine-piperidine derivative (see for example patent application WO2006088921).

5 In another particular embodiment, the compound according to the invention may be a pyridyl and phenyl substituted piperazine-piperidine derivative (see for example patent application WO2006088919).

10 In another particular embodiment, the compound according to the invention may be a piperazine-piperidine derivative (see for example patent application WO2006088836).

In another particular embodiment, the compound according to the invention may be a heteroaryl substituted pyrazinyl-piperazine-piperidine derivative (see for example patent application WO2006091428).

15 In another particular embodiment, the compound according to the invention may be an amine-linked pyridyl and phenyl substituted piperazine-piperidine derivative (see for example patent application WO2006088920).

20 In another particular embodiment, the compound according to the invention may be a thiazole derivative (see for example patent application WO2007064553).

In another particular embodiment, the compound according to the invention may be a substituted heterocyclic derivative (see for example patent application WO2007047202).

25 In another embodiment, CXCR3 antagonist of the invention may be an anti-CXCR3 antibody which neutralizes CXCR3 or an anti-CXCR3 fragment thereof which neutralizes CXCR3 (see for example Xie JH et Al., 2003).

30 Antibodies directed against CXCR3 can be raised according to known methods by administering the appropriate antigen or epitope to a host animal selected, e.g., from pigs, cows, horses, rabbits, goats, sheep, and mice, among others. Various adjuvants known in the art can be used to enhance antibody production. Although antibodies useful in practicing the invention can be polyclonal, monoclonal antibodies are preferred. Monoclonal antibodies against CXCR3 can be prepared and isolated using any technique that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. Techniques for

production and isolation include but are not limited to the hybridoma technique originally described by Kohler and Milstein (1975); the human B-cell hybridoma technique (Cote et al., 1983); and the EBV-hybridoma technique (Cole et al. 1985). Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (see e.g., U.S. Pat. No. 4,946,778) can be adapted to produce anti-CXCR3 single chain antibodies. CXCR3 antagonists useful in practicing the present invention also include anti-CXCR3 antibody fragments including but not limited to F(ab')₂ fragments, which can be generated by pepsin digestion of an intact antibody molecule, and Fab fragments, which can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')₂ fragments. Alternatively, Fab and/or scFv expression libraries can be constructed to allow rapid identification of fragments having the desired specificity to CXCR3.

Humanized anti-CXCR3 antibodies and antibody fragments therefrom can also be prepared according to known techniques. "Humanized antibodies" are forms of non-human (e.g., rodent) chimeric antibodies that contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a hypervariable region (CDRs) of the recipient are replaced by residues from a hypervariable region of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, rabbit or nonhuman primate having the desired specificity, affinity and capacity. In some instances, framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues that are not found in the recipient antibody or in the donor antibody. These modifications are made to further refine antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the hypervariable loops correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FRs are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody optionally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. Methods for making humanized antibodies are described, for example, by Winter (U.S. Pat. No. 5,225,539) and Boss (Celltech, U.S. Pat. No. 4,816,397).

Then, for this invention, neutralizing antibodies of CXCR3 are selected.

In still another embodiment, CXCR3 antagonists may be selected from aptamers. Aptamers are a class of molecule that represents an alternative to antibodies in term of molecular recognition. Aptamers are oligonucleotide or oligopeptide sequences with the

capacity to recognize virtually any class of target molecules with high affinity and specificity. Such ligands may be isolated through Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) of a random sequence library, as described in Tuerk C. and Gold L., 1990. The random sequence library is obtainable by combinatorial chemical synthesis of
5 DNA. In this library, each member is a linear oligomer, eventually chemically modified, of a unique sequence. Possible modifications, uses and advantages of this class of molecules have been reviewed in Jayasena S.D., 1999. Peptide aptamers consists of a conformationally constrained antibody variable region displayed by a platform protein, such as E. coli Thioredoxin A that are selected from combinatorial libraries by two hybrid methods (Colas et
10 al., 1996).

Then, for this invention, neutralizing aptamers of CXCR3 are selected.

In a preferred embodiment, the compound according to the invention is an inhibitor of the CXCR3 receptor expression.

15 Small inhibitory RNAs (siRNAs) can also function as inhibitors of CXCR3 receptor gene expression for use in the present invention. CXCR3 receptor gene expression can be reduced by contacting a subject or cell with a small double stranded RNA (dsRNA), or a vector or construct causing the production of a small double stranded RNA, such that CXCR3 receptor gene expression is specifically inhibited (i.e. RNA interference or RNAi). Methods
20 for selecting an appropriate dsRNA or dsRNA-encoding vector are well known in the art for genes whose sequence is known (e.g. see for example Tuschl, T. et al. (1999); Elbashir, S. M. et al. (2001); Hannon, GJ. (2002); McManus, MT. et al. (2002); Brummelkamp, TR. et al. (2002); U.S. Pat. Nos. 6,573,099 and 6,506,559; and International Patent Publication Nos. WO 01/36646, WO 99/32619, and WO 01/68836).

25 Ribozymes can also function as inhibitors of CXCR3 receptor gene expression for use in the present invention. Ribozymes are enzymatic RNA molecules capable of catalyzing the specific cleavage of RNA. The mechanism of ribozyme action involves sequence specific hybridization of the ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. Engineered hairpin or hammerhead motif ribozyme molecules that
30 specifically and efficiently catalyze endonucleolytic cleavage of CXCR3 receptor mRNA sequences are thereby useful within the scope of the present invention. Specific ribozyme cleavage sites within any potential RNA target are initially identified by scanning the target molecule for ribozyme cleavage sites, which typically include the following sequences, GUA, GUU, and GUC. Once identified, short RNA sequences of between about 15 and 20

ribonucleotides corresponding to the region of the target gene containing the cleavage site can be evaluated for predicted structural features, such as secondary structure, that can render the oligonucleotide sequence unsuitable. The suitability of candidate targets can also be evaluated by testing their accessibility to hybridization with complementary oligonucleotides, using, e.g., ribonuclease protection assays.

Both antisense oligonucleotides and ribozymes useful as inhibitors of CXCR3 receptor gene expression can be prepared by known methods. These include techniques for chemical synthesis such as, e.g., by solid phase phosphoramidite chemical synthesis. Alternatively, anti-sense RNA molecules can be generated by *in vitro* or *in vivo* transcription of DNA sequences encoding the RNA molecule. Such DNA sequences can be incorporated into a wide variety of vectors that incorporate suitable RNA polymerase promoters such as the T7 or SP6 polymerase promoters. Various modifications to the oligonucleotides of the invention can be introduced as a means of increasing intracellular stability and half-life. Possible modifications include but are not limited to the addition of flanking sequences of ribonucleotides or deoxyribonucleotides to the 5' and/or 3' ends of the molecule, or the use of phosphorothioate or 2'-O-methyl rather than phosphodiesterase linkages within the oligonucleotide backbone.

Antisense oligonucleotides siRNAs and ribozymes of the invention may be delivered *in vivo* alone or in association with a vector. In its broadest sense, a "vector" is any vehicle capable of facilitating the transfer of the antisense oligonucleotide siRNA or ribozyme nucleic acid to the cells and preferably cells expressing CXCR3 receptor. Preferably, the vector transports the nucleic acid to cells with reduced degradation relative to the extent of degradation that would result in the absence of the vector. In general, the vectors useful in the invention include, but are not limited to, plasmids, phagemids, viruses, other vehicles derived from viral or bacterial sources that have been manipulated by the insertion or incorporation of the the antisense oligonucleotide siRNA or ribozyme nucleic acid sequences. Viral vectors are a preferred type of vector and include, but are not limited to nucleic acid sequences from the following viruses: retrovirus, such as moloney murine leukemia virus, harvey murine sarcoma virus, murine mammary tumor virus, and rouse sarcoma virus; adenovirus, adeno-associated virus; SV40-type viruses; polyoma viruses; Epstein-Barr viruses; papilloma viruses; herpes virus; vaccinia virus; polio virus; and RNA virus such as a retrovirus. One can readily employ other vectors not named but known to the art.

Preferred viral vectors are based on non-cytopathic eukaryotic viruses in which non-essential genes have been replaced with the gene of interest. Non-cytopathic viruses include retroviruses (e.g., lentivirus), the life cycle of which involves reverse transcription of genomic

viral RNA into DNA with subsequent proviral integration into host cellular DNA. Retroviruses have been approved for human gene therapy trials. Most useful are those retroviruses that are replication-deficient (i.e., capable of directing synthesis of the desired proteins, but incapable of manufacturing an infectious particle). Such genetically altered
5 retroviral expression vectors have general utility for the high-efficiency transduction of genes in vivo. Standard protocols for producing replication-deficient retroviruses (including the steps of incorporation of exogenous genetic material into a plasmid, transfection of a packaging cell lined with plasmid, production of recombinant retroviruses by the packaging cell line, collection of viral particles from tissue culture media, and infection of the target cells
10 with viral particles) are provided in Kriegler, 1990 and in Murry, 1991).

Preferred viruses for certain applications are the adeno-viruses and adeno-associated viruses, which are double-stranded DNA viruses that have already been approved for human use in gene therapy. The adeno-associated virus can be engineered to be replication deficient and is capable of infecting a wide range of cell types and species. It further has advantages
15 such as, heat and lipid solvent stability; high transduction frequencies in cells of diverse lineages, including hemopoietic cells; and lack of superinfection inhibition thus allowing multiple series of transductions. Reportedly, the adeno-associated virus can integrate into human cellular DNA in a site-specific manner, thereby minimizing the possibility of insertional mutagenesis and variability of inserted gene expression characteristic of retroviral
20 infection. In addition, wild-type adeno-associated virus infections have been followed in tissue culture for greater than 100 passages in the absence of selective pressure, implying that the adeno-associated virus genomic integration is a relatively stable event. The adeno-associated virus can also function in an extrachromosomal fashion.

Other vectors include plasmid vectors. Plasmid vectors have been extensively
25 described in the art and are well known to those of skill in the art. See e.g. Sambrook et al., 1989. In the last few years, plasmid vectors have been used as DNA vaccines for delivering antigen-encoding genes to cells in vivo. They are particularly advantageous for this because they do not have the same safety concerns as with many of the viral vectors. These plasmids, however, having a promoter compatible with the host cell, can express a peptide from a gene
30 operatively encoded within the plasmid. Some commonly used plasmids include pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40, and pBlueScript. Other plasmids are well known to those of ordinary skill in the art. Additionally, plasmids may be custom designed using restriction enzymes and ligation reactions to remove and add specific fragments of DNA. Plasmids may be delivered by a variety of parenteral, mucosal and topical routes. For example, the DNA

plasmid can be injected by intramuscular, eye, intradermal, subcutaneous, or other routes. It may also be administered by intranasal sprays or drops, rectal suppository and orally. It may also be administered into the epidermis or a mucosal surface using a gene-gun. The plasmids may be given in an aqueous solution, dried onto gold particles or in association with another
5 DNA delivery system including but not limited to liposomes, dendrimers, cochleate and microencapsulation.

In a preferred embodiment, the antisense oligonucleotide, siRNA, shRNA or ribozyme nucleic acid sequence is under the control of a heterologous regulatory region, e.g., a heterologous promoter. The promoter may be specific for Muller glial cells, microglia cells,
10 endothelial cells, pericyte cells and astrocytes. For example, a specific expression in Muller glial cells may be obtained through the promoter of the glutamine synthetase gene is suitable. The promoter can also be, e.g., a viral promoter, such as CMV promoter or any synthetic promoters.

15 Another object of the invention relates to a method for treating glaucoma comprising administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of compound which is an antagonist of CXCR3 or an inhibitor of the CXCR3 receptor expression as described above.

In one aspect, the invention relates to a method for treating glaucoma comprising
20 administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a CXCR3 antagonist as above described.

Compounds of the invention may be administered in the form of a pharmaceutical composition, as defined below.

25 Preferably, said compound which is an antagonist of CXCR3 or an inhibitor of the CXCR3 receptor expression.

By a "therapeutically effective amount" is meant a sufficient amount of compound to treat and/or to prevent glaucoma disorder.

It will be understood that the total daily usage of the compounds and compositions of
30 the present invention will be decided by the attending physician within the scope of sound medical judgment. The specific therapeutically effective dose level for any particular patient will depend upon a variety of factors including the disorder being treated and the severity of the disorder; activity of the specific compound employed; the specific composition employed, the age, body weight, general health, sex and diet of the patient; the time of administration,

route of administration, and rate of excretion of the specific compound employed; the duration of the treatment; drugs used in combination or coincidental with the specific polypeptide employed; and like factors well known in the medical arts. For example, it is well within the skill of the art to start doses of the compound at levels lower than those required to achieve the desired therapeutic effect and to gradually increase the dosage until the desired effect is achieved. However, the daily dosage of the products may be varied over a wide range from 0.01 to 1,000 mg per adult per day. Preferably, the compositions contain 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 and 500 mg of the active ingredient for the symptomatic adjustment of the dosage to the patient to be treated. A medicament typically contains from about 0.01 mg to about 500 mg of the active ingredient, preferably from 1 mg to about 100 mg of the active ingredient. An effective amount of the drug is ordinarily supplied at a dosage level from 0.0002 mg/kg to about 20 mg/kg of body weight per day, especially from about 0.001 mg/kg to 7 mg/kg of body weight per day.

Compounds according to the invention may be used for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of a glaucoma disorder.

Hence, the present invention also provides a pharmaceutical composition comprising an effective dose of an antagonist of CXCR3 or an inhibitor of the CXCR3 receptor expression, preferably a CXCR3 antagonist, according to the invention.

Any therapeutic agent of the invention may be combined with pharmaceutically acceptable excipients, and optionally sustained-release matrices, such as biodegradable polymers, to form therapeutic compositions.

"Pharmaceutically" or "pharmaceutically acceptable" refers to molecular entities and compositions that do not produce an adverse, allergic or other untoward reaction when administered to a mammal, especially a human, as appropriate. A pharmaceutically acceptable carrier or excipient refers to a non-toxic solid, semi-solid or liquid filler, diluent, encapsulating material or formulation auxiliary of any type.

The form of the pharmaceutical compositions, the route of administration, the dosage and the regimen naturally depend upon the condition to be treated, the severity of the illness, the age, weight, and sex of the patient, etc.

The pharmaceutical compositions of the invention can be formulated for a topical, oral, intranasal, parenteral, intraocular, intravenous, intramuscular or subcutaneous administration and the like.

Preferably, compositions of the inventions may be formulated for intraocular either with eye drops, subconjunctival or intravitreal administration.

More preferably, local ocular routes should be used such as intravitreal, topical, periocular injections (sub conjunctival, peri bulbar, latero bulbar, retro bulbar, sub tenon, supra choroidal), intra or peri ocular implants (intra sceral, peri scleral, episcleral), intra
5 vitreous implants or any releasing systems such as emulsions, solid non biodegradable or degradable implants or tablets, mini pumps or any topical formulations.

Preferably, the pharmaceutical compositions contain vehicles which are pharmaceutically acceptable for a formulation capable of being injected. These may be in
10 particular isotonic, sterile, saline solutions (monosodium or disodium phosphate, sodium, potassium, calcium or magnesium chloride and the like or mixtures of such salts), or dry, especially freeze-dried compositions which upon addition, depending on the case, of sterilized water or physiological saline, permit the constitution of injectable solutions.

The doses used for the administration can be adapted as a function of various
15 parameters, and in particular as a function of the mode of administration used, of the relevant pathology, or alternatively of the desired duration of treatment.

In addition, other pharmaceutically acceptable forms include, e.g. tablets or other solids for oral administration; time release capsules; and any other form currently can be used.

Active ingredient may be also delivered directly to the eye by ocular tissue injection
20 such as periocular, conjunctival, subtenon, intracameral, intravitreal, intraocular, subretinal, subconjunctival, retrobulbar, or intracanalicular injections; by direct application to the eye using a catheter or other placement device such as a retinal pellet, intraocular insert, suppository or an implant comprising a porous, non-porous, or gelatinous material; by topical ocular drops or ointments; or by a slow release device in the cul-de-sac or implanted adjacent
25 to the sclera (transscleral) or in the sclera (intrascleral) or within the eye. Intracameral injection may be through the cornea into the anterior chamber to allow the agent to reach the trabecular meshwork. Intracanalicular injection may be into the venous collector channels draining Schlemm's canal or into Schlemm's canal.

For ophthalmic delivery, an active ingredient may be combined with
30 ophthalmologically acceptable preservatives, co-solvents, surfactants, viscosity enhancers, penetration enhancers, buffers, sodium chloride, or water to form an aqueous, sterile ophthalmic suspension or solution. Solution formulations may be prepared by dissolving the active ingredient in a physiologically acceptable isotonic aqueous buffer. Further, the solution may include an acceptable surfactant to assist in dissolving the active ingredient. Viscosity

building agents, such as hydroxymethyl cellulose, hydroxyethyl cellulose, methylcellulose, polyvinylpyrrolidone, or the like may be added to the compositions of the present invention to improve the retention of the compound.

5 In order to prepare a sterile ophthalmic ointment formulation, the active ingredient is combined with a preservative in an appropriate vehicle, such as mineral oil, liquid lanolin, or white petrolatum. Sterile ophthalmic gel formulations may be prepared by suspending the active ingredient in a hydrophilic base prepared from the combination of, for example, CARBOPOL®-940 (BF Goodrich, Charlotte, NC), or the like, according to methods known in the art. VISCOAT® (Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX) may be used for
10 intraocular injection, for example. Other compositions of the present invention may contain penetration enhancing agents such as cremephor and TWEEN® 80 (polyoxyethylene sorbitan monolaureate, Sigma Aldrich, St. Louis, MO), in the event the active ingredient is less penetrating in the eye.

15 The invention will be further illustrated by the following figure and example. However, the example and figure should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.

FIGURE

20 **Figure 1: In vivo effect of the CXCR3 inhibitor NBI74330 on the intraocular pressure (IOP) in a rat model of surgically-induced glaucoma.**

Subconjunctival injections of NBI74330 (10 μ M) or vehicle were performed in glaucoma eyes and in control eyes. One single injection of NBI (A) induced a reduction in IOP during 3 days ($p < 0.001$). Two injections of NBI (A and B) induced a decrease in IOP
25 during 12 days ($p < 0.001$). NBI or vehicle injections in control eyes did not influence the IOP. (In vivo measurements of the IOP using TonoPen).

EXAMPLE

Material & Methods

30 **Animal model and in vivo experiments.**

Male 8-week-old Brown Norway rats weighing 300-400 g were housed in Jussieu animal house (UMRS968, Vision Institute, Paris, France). All experiments were conducted in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology for the Use of

Animals in Ophthalmic research. Ocular integrity was checked using slit lamp biomicroscope. Surgical model of elevated IOP was induced in the right eye of each rat by cauterization of three episcleral veins after conjunctival dissection as previously reported [Bayer AU et AL., 2001 and Garcia-Valenzuela E et AL., 1995] under general anaesthesia (intra peritoneal injection of ketamine 75mg/kg and xylazine 10mg/kg). Left eyes underwent conjunctival dissection only as controls. After the surgery, animals were maintained for a 1-month period and monitored for IOP three times a week using a handheld tonometer (Tonopen, Medtronic, Jacksonville, FL) without sedation. 30 animals presenting a stable elevated IOP were included and randomly divided in three equal groups: in both eyes, 10 rats received one subconjunctival injection of NBI74330 (10 μ M, 100 μ l), 10 rats received one injection of NBI74330 followed by a second one five days after, and 10 rats received a vehicle injection (PBS, 100 μ l). IOP was monitored every two days by one independent person i.e. who was blind of the treatment. At the end of the experiments, animals were euthanized and the eyes were immediately conditioned for IHC.

15

Results

Treatment with a CXCR3 antagonist lowers the intra ocular pressure and reduces TM cell apoptosis in a rat model of glaucoma.

Subconjunctival injection of NBI74330 (10 μ M, 100 μ l) induced an IOP lowering in an animal eye model of surgically-induced elevated IOP (Figure). In the group undergoing a single injection, this effect was significant the 2nd to the 5th day after the treatment, reaching the average IOP level of control eyes. When a second injection was performed 4 days after the first one, a significantly low IOP was maintained until the end of the experiments. Subconjunctival injection of AMD3100 did not influence the IOP in operated eyes (data not shown). In non-operated control eyes, NBI74330, AMD3100 or PBS had no effect on the basal IOP level.

Eyes were conditioned into cryosections and assessed for apoptosis using TUNEL-labeling. TM was identified in each cryosections as a pigmented slim tissue on the posterior sclera-cornea beside the iris root and just above the endothelial Schlemm's canals. Apoptosis was higher in trabecular cells of untreated glaucoma eyes than in glaucoma eyes treated with NBI74330. Moreover, endothelial Schlemm cells and retinal cells –especially in the inner nuclear layer and ganglion cell layer- presented more TUNEL labeling in the untreated glaucoma eyes than in glaucoma eyes treated with NBI74330.

So, we can conclude that all antagonist of CXCR3 and all inhibitor of the CXCR3 receptor expression may be used for the treatment of glaucoma.

REFERENCES

- 5 Allen DR, Bolt A, Chapman GA, et al. Identification and structure-activity relationships of 1-aryl-3-piperidin-4-yl-urea derivatives as CXCR3 receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 2007;17:697-701.
- An-Rong Lia, Michael G. Johnsona, Jiwen Liua, Xiaoqi Chena, Xiaohui Dua, Jeffrey T. Mihalica, Jeffrey Deignana, Darin J. Gustina, Jason Duquettea, Zice Fua, Liusheng Zhua, Andrew P. Marcusa, Phillipe Bergerona, Lawrence R. McGee, Jay Danaoa, Bryan Lemona, 10 Teresa Carabeoa, Timothy Sullivan, Ji Maa, Liang Tanga, George Tonna, Tassie L. Collinsa and Julio C. Medina. Optimization of the heterocyclic core of the quinazolinone-derived CXCR3 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008 Jan 15;18(2):688-93.
- Bayer AU, Danias J, Brodie S, Maag KP, Chen B, Shen F, Podos SM, Mittag TW. 15 Electroretinographic abnormalities in a rat glaucoma model with chronic elevated intraocular pressure. *Exp Eye Res*. 2001;72:667-77.
- Bongartz JP, Buntinx M, Coesemans E, et al. Synthesis and structure-activity relationship of benzetimide derivatives as human CXCR3 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 2008.
- 20 Cedrone C, Mancino R, Cerulli A, Cesareo M, Nucci C. Epidemiology of primary glaucoma: prevalence, incidence, and blinding effects. *Prog Brain Res*. 2008;173:3-14.
- Choudhary MS, Sachs N, Uluer A, et al. Differential ergoline and ergopeptine binding to 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors: ergolines require an aromatic residue at position 340 for high affinity binding. *Mol Pharmacol* 1995;47:450-7.
- 25 Cole AG, Stroke IL, Brescia MR, et al. Identification and initial evaluation of 4-N-aryl-[1,4]diazepane ureas as potent CXCR3 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16:200-3.
- Du X, Chen X, Mihalic JT, Deignan J, Duquette J, Li AR, Lemon B, Ma J, Miao S, Ebsworth K, Sullivan TJ, Tonn G, Collins TL, Medina JC. Design and optimization of 30 imidazole derivatives as potent CXCR3 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008 Jan 15;18(2):608-13.
- Garcia-Valenzuela E, Shareef S, Walsh J, Sharma SC. Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res*. 1995;61:33-44.

Gebhard Thoma, Rolf Baenteli, Ian Lewis, Trixie Wagner, Lukas Oberer, Wolfgang Blum, Fraser Glickman, Markus B. Streiff, Hans-Guenter Zerwes. Special ergolines are highly selective, potent antagonists of the chemokine receptor CXCR3: Discovery, characterization and preliminary SAR of a promising lead. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19 (2009) 6185–6188.

Hayes ME, Breinlinger EC, Wallace GA, et al. Lead identification of 2-iminobenzimidazole antagonists of the chemokine receptor CXCR3. *Bioorg Med Chem Lett* 2008;18:2414-9.

Hayes ME, Wallace GA, Grongsaard P, et al. Discovery of small molecule benzimidazole antagonists of the chemokine receptor CXCR3. *Bioorg Med Chem Lett* 2008;18:1573-6.

James E Pease & Richard Horuk. Chemokine receptor antagonists: part 2. *Expert Opin. Ther. Patents* (2009) 19(2):199-221.

Jiwen Liu, Zice Fua, An-Rong Lia, Michael Johnsona, Liusheng Zhua, Andrew Marcusa, Jay Danaoa, Tim Sullivana, George Tonna, Tassie Collinsa and Julio Medinaa. Optimization of a series of quinazolinone-derived antagonists of CXCR3. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009 Sep 1;19(17):5114-8.

Jopling LA, Watt GF, Fisher S, Birch H, Coggon S, Christie MI. Analysis of the pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship of a small molecule CXCR3 antagonist, NBI-74330, using a murine CXCR3 internalization assay. *Br J Pharmacol*. 2007;152:1260-71.

Johnson M, Li AR, Liu J, Fu Z, Zhu L, Miao S, Wang X, Xu Q, Huang A, Marcus A, Xu F, Ebsworth K, Sablan E, Danao J, Kumer J, Dairaghi D, Lawrence C, Sullivan T, Tom G, Schall T, Collins T, Medina J. Discovery and optimization of a series of quinazolinone-derived antagonists of CXCR3. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007 Jun 15;17(12):3339-43.

Knight RL, Allen DR, Birch HL, et al. Development of CXCR3 antagonists. Part 4: discovery of 2-amino-(4-tropinyl)quinolines. *Bioorg Med Chem Lett* 2008;18:629-33

James E Pease & Richard Horuk. Chemokine receptor antagonists: part 2. *Expert Opin. Ther. Patents* (2009) 19(2):199-221.

Liu J, Fu Z, Li AR, Johnson M, Zhu L, Marcus A, Danao J, Sullivan T, Tom G, Collins T, Medina J. Optimization of a series of quinazolinone-derived antagonists of CXCR3. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009 Sep 1;19(17):5114-8. Epub 2009 Jul 10.

McGuinness BF, Carroll CD, Zawacki LG, Dong G, Yang C, Hobbs DW, Jacob-Samuel B, Hall JW 3rd, Jenh CH, Kozlowski JA, Anilkumar GN, Rosenblum SB. Novel

CXCR3 antagonists with a piperazinyl-piperidine core. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009 Sep 1;19(17):5205-8. Epub 2009 Jul 9.

Rosenblum JM, Zhang QW, Siu G, Collins TL, Sullivan T, Dairaghi DJ, Medina JC, Fairchild RL. CXCR3 antagonism impairs the development of donor-reactive, IFN-gamma-producing effectors and prolongs allograft survival. *Transplantation*. 2009 Feb 15;87(3):360-9. Sommer A. Intraocular pressure and glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 1989;107:186-8.

Sommer A. Intraocular pressure and glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 1989;107:186-8.

Vergote D, Butler GS, Ooms M, Cox JH, Silva C, Hollenberg MD, Jhamandas JH, Overall CM, Power C. Proteolytic processing of SDF-1alpha reveals a change in receptor specificity mediating HIV-associated neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:19182-7.

Verzijl D, Storelli S, Scholten DJ, et al. Noncompetitive antagonism and inverse agonism as mechanism of action of nonpeptidergic antagonists at primate and rodent CXCR3 chemokine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;325:544-55.

Wang Y, Busch-Petersen J, Wang F, Kiesow TJ, Graybill TL, Jin J, Yang Z, Foley JJ, Hunsberger GE, Schmidt DB, Sarau HM, Capper-Spudich EA, Wu Z, Fisher LS, McQueney MS, Rivero RA, Widdowson KL. Camphor sulfonamide derivatives as novel, potent and selective CXCR3 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009 Jan 1;19(1):114-8. Epub 2008 Nov 6.

Watson RJ, Allen DR, Birch HL, et al. Development of CXCR3 antagonists. Part 2: Identification of 2-amino(4-piperidinyl)azoles as potent CXCR3 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 2007;17:6806-10.

Watson RJ, Allen DR, Birch HL, et al. Development of CXCR3 antagonists. Part 3: Tropanyl and homotropanyl-piperidine urea derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 2008;18:147-51.

Xie JH, Nomura N, Lu M, et al. Antibody-mediated blockade of the CXCR3 chemokine receptor results in diminished recruitment of T helper 1 cells into sites of inflammation. *J Leukoc Biol* 2003;73:771-80.

Throughout this application, various references describe the state of the art to which this invention pertains. The disclosures of these references are hereby incorporated by reference into the present disclosure.

CLAIMS

1. A compound which is an antagonist of CXCR3 or an inhibitor of the CXCR3 receptor expression for use in the treatment of glaucoma.
- 5 2. The compound according to the claim 1, wherein said compound is an antagonist of CXCR3.
3. The compound according to the claim 1, wherein the compound is the NBI74330, AMG487 or AMG1237845.
- 10 4. The compound according to any one of claims 1 to 3, wherein said compound is a compound which inhibits the level of the CXCR3 protein on the cell surface.
5. The compound according to any one of claims 1 to 4 wherein the glaucoma is an "open angle" or an "angle-closure" glaucoma.
- 15 6. A pharmaceutical composition for use in the treatment of glaucoma comprising a compound according to any one of claims 1 to 4 and a pharmaceutically acceptable carrier.

2 ARTICLES SOUMIS POUR PUBLICATION

2.1 Article1

The chemokine receptor CXCR3 and a cleaved form of CXCL12 are involved in ocular hypertension in glaucoma.

Alexandre Denoyer¹⁻⁴, David Godefroy^{1,2}, Isabelle Célérier⁵, Julie Frugier¹⁻³, Julie Degardin¹⁻³, Jeffrey K. Harrison⁶, Françoise Brignole-Baudouin^{1-4,7}, Serge Picaud¹⁻³, William Rostène¹⁻³, and Christophe Baudouin^{1,4}.

- 1) INSERM, U968, Paris, France.
- 2) UPMC University Paris 06, UMR_S 968, Institut de la Vision, Paris, France.
- 3) CNRS, UMR_7210, Paris, France.
- 4) Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts, Paris, France
- 5) INSERM, U872, UPMC University Paris 06, Team 1, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France.
- 6) Department of Pharmacology & Therapeutics, College of Medicine, University of Florida, Gainesville, FL, USA.
- 7) Department of Toxicology, Faculty of Biological and Pharmacological Sciences, University René Descartes Paris 05, Paris, France.

Corresponding author:

Alexandre Denoyer, MD, PhD-

INSERM UPMC, UMR_S968, Institut de la Vision, Equipe 8, 17 rue Moreau, Paris, F-75012, France

Tel: + 33 153 462 572 / +33 661 133 460

alexandre.denoyer@gmail.com

Disclosure: the authors declare no financial interest.

Key words: *receptor antagonist; apoptosis; aqueous humor outflow; chemokine; CXCL12; SDF-1(5-67); CXCR3; CXCR4; CXCR7; glaucoma; intraocular pressure; trabecular meshwork.*

Character count: 29451

Abstract

Primary open-angle glaucoma (POAG), the most common cause of irreversible blindness in the world, is a neuropathy characterized by retinal ganglion cell (RGC) death commonly initiated by pathological elevation of intraocular pressure (IOP). Ocular hypertension (OHT) is due to unknown mechanisms of trabecular meshwork (TM) dysfunction and degeneration. Current antiglaucoma treatments aim at lowering IOP but do not target the causal trabecular pathology. As a result, it is not curative. The chemokine CXCL12, and its cognate receptor CXCR4, are involved in immune system trafficking, cell survival and tissue remodeling. Proteolytic cleavage of CXCL12 has been reported to yield a toxic form, SDF-1(5-67), capable of binding another chemokine receptor, CXCR3. Here we show that CXCL12, SDF-1(5-67), CXCR3, and CXCR4 were expressed by human glaucomatous trabecular cells (TCs). In a rat model of glaucoma, ophthalmic administration of a selective CXCR3 antagonist reduced OHT by inhibiting TC apoptosis and improving TM function. In contrast, intraocular injection of SDF-1(5-67) increased IOP. In a TC model of apoptosis, CXCL12, via CXCR4, protected cells from apoptotic death whereas SDF-1(5-67) induced apoptosis through CXCR3 and caspase-3 activation. These data demonstrate the involvement of a specific chemokine-chemokine receptor axis in a TM pathophysiology and establish that selective blockade of CXCR3 in glaucoma eyes can regulate IOP by directly restoring the TM function.

INTRODUCTION

Primary open-angle glaucoma (POAG) is the second leading cause of blindness and the first cause of irreversible blindness in the world. POAG affects about 70 million people and is predicted to account for over 11 million cases of blindness by 2020 (Quigley and Broman, 2006; Cedrone et al., 2008). Its prevalence continues to increase as the population ages. POAG is a retinal neuropathy characterized by retinal ganglion cell (RGC) death. Pathological elevation of intraocular pressure (IOP), namely ocular hypertension (OHT), is the most critical risk factor for both the development and the progression of POAG (Sommer, 1989). OHT is often diagnosed several years before detecting the neuropathy. It is attributed to a decrease in trabecular meshwork (TM) outflow facility to aqueous humor (AH) caused by TM degeneration whose primary mechanisms are still unclear. Classical antiglaucoma treatments reduce the abnormally elevated IOP but do not target directly the initial TM degeneration. In clinical practice, progressive therapeutic inefficiency in controlling both the elevation of IOP and neuropathy often occurs (Kass et al., 2002). The lack of specific therapies for the TM pathology, that is still developing in well-treated patients, leads to progressive treatment inefficiency coupled with neuropathy worsening and sometimes blindness.

The TM is a highly specific ocular entity located at the angle formed by the cornea and iris, whose primary function is to control IOP by regulating the AH outflow. TM degeneration has largely been demonstrated as the main cause of aqueous outflow resistance in POAG and consequently elevated IOP (Tektaş and Lütjen-Drecoll, 2009). The main glaucoma-related trabecular modifications resemble age-related TM degeneration and involve accumulation of trabecular extracellular matrix together with a decrease in TM cellularity as previously described by our group and others (Alvarado et al., 1984; Rohen et al., 1984; Grierson and Howes, 1987; Hamard et al., 2002). TC loss that occurs in glaucoma, however, is not fully understood. It is known to develop through apoptotic phenomena and was found as a characteristic of POAG (Baleriola et al., 2008), but its causal mechanisms are still unknown.

Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), termed CXCL12, belongs to the CXC subfamily of chemokines. CXCL12 is known to bind mainly to a G-protein coupled receptor, CXCR4. Recently, CXCR7 has been identified as an additional receptor for

CXCL12 (Burns et al., 2006; Thelen and Thelen, 2008; Maksym et al., 2009). In addition to its involvement in the immune system (Nagasawa et al., 1994; Estes et al., 2004; Dieu-Nosjean et al., 1999), CXCL12 is also involved in axonal development and neurotransmission (Rostene et al., 2007; Li and Rosohoff, 2008), migration, proliferation, and survival of cancer cells (Muller et al., 2001), and ECM adhesion of haematopoietic cells in bone marrow or damaged tissues (Lapidot et al., 2005; Son et al., 2006). In the eye, CXCL12 and CXCR4 have been hypothesized to play a role in neovascularization and in ocular inflammation because they were detected in the retina (Crane et al., 2000; Bhutto et al., 2006), the cornea (Bourcier et al., 2003), and the AH (Curnow et al., 2004). MMP proteolysis is one of the regulating factors for chemokine activity (McQuibban et al., 2000). Proteolytic processing of CXCL12 yields a wide variety of amino-terminal truncated proteins that lose their ability to bind to CXCR4 (McQuibban et al., 2001) as this chemokine–receptor interaction requires the CXCL12 N-terminal residues (Valenzuela-Fernandez et al., 2002). One of the cleaved forms of CXCL12, SDF-1(5-67), has been reported to induce neuronal apoptosis during HIV brain infection (Zhang et al., 2003). Recently, SDF-1(5-67) has been shown to bind specifically to another chemokine receptor, CXCR3, where it induces neuronal apoptosis in a caspase-3-dependent manner (Vergote et al., 2006).

Given the key role of CXCL12 in cell survival and ECM remodeling and the putative cytotoxic properties of its truncated form *via* CXCR3, we hypothesized that it is involved in the TM degeneration associated with POAG. In the present study, CXCR3 and CXCR4 expression were evaluated in human glaucomatous TM tissue as well as in cultured TCs. Non-peptide specific antagonists of CXCR3 and CXCR4 were studied for their *in vivo* effects on OHT. We found that blocking CXCR3 *in vivo* lowered IOP and further reduced RGC apoptosis in an animal model of glaucoma. CXCL12 and SDF-1(5-67) were also found to be produced by TCs under the control of MMPs and cytokines known to be involved in POAG. Our *in vivo* and *in vitro* findings revealed that SDF-1(5-67) induced TC apoptosis through CXCR3, and that blocking CXCR3 protected TCs from apoptosis and restored the filtrating function of the TM. Our data suggest that pathological enhancement of a SDF-1(5-67)/CXCR3 interaction is involved in the initial TM degeneration observed in POAG and could be specifically antagonized in order to prevent the progression of the disease.

RESULTS

Human glaucomatous trabecular tissues and TCs expressed CXCL12, CXCR3 and CXCR4. RT-PCR analysis of human TM tissues obtained from fifteen glaucomatous patients was performed and mRNAs for CXCL12, CXCR3 and CXCR4 were detected in all specimens (**Figure 1a**). Similarly, CXCL12, CXCR3 and CXCR4 mRNAs were expressed in a human glaucomatous TC line (Pang et al., 1994). The chemokine and both receptors were also detected by immunohistofluorescence (IHF) confocal microscopy of human glaucomatous TCs (**Figure 1b,c,d**). At higher magnification, CXCR3 and CXCR4 immunoreactivity appeared as a punctate pattern of localization on the cell surface membrane. Flow cytometry (FCM) confirmed the expression of these proteins in unstimulated TCs (**Figure 1e**). Finally, TCs were able to release CXCL12 as determined by ELISA of cell supernatants (22.8 ± 5.28 pg/ml from 100,000 cells/mL sample grown for 24 h to 80% confluence in 6-well plates).

In vivo treatment with a CXCR3 antagonist reduced IOP and protected RGCs in a rat model of glaucoma. We tested *in vivo* whether CXCR3 and/or CXCR4 were implicated in the regulation of IOP by using non-peptide selective antagonists of both chemokine receptors in an animal model of experimental glaucoma. Briefly, OHT was surgically induced by cauterizing episcleral veins in rat eyes as previously described (Garcia-Valenzuela et al., 1995). Subconjunctival injections of AMD-3100 (Donzela et al., 1998; Khan et al., 2007) (1 μ M, 100 μ L) or NBI-74330 (Medina et al., 2004; Heise et al., 2005) (1 μ M, 100 μ L), selective antagonists for CXCR4 and CXCR3 respectively, were performed. A single injection of NBI-74330 induced a maximal decrease in IOP three days after the treatment, reaching the normal IOP values observed in control nonglaucomatous eyes (**Figure 2a**). This decrease in IOP was transient since IOP returned to elevated values of untreated eyes after 6 days. When a second injection was given at the time of maximal decrease, IOP remained low during the remaining experimental time frame. The reduction in IOP was associated with a decrease in RGC apoptosis as assessed by TUNEL-labeling (4.01 ± 0.86 , 11.11 ± 3.62 , and 5.73 ± 1.15 apoptotic RGCs/mm for control eyes, untreated glaucomatous eyes, and NBI-treated glaucomatous eyes respectively; $P < 0.05$ between each group). NBI-74330 reduced IOP in a dose-dependent manner (**Figure 2b**). In contrast to blockade of CXCR3, subconjunctival injections of a CXCR4 selective antagonist, AMD-3100, did not influence IOP in glaucomatous eyes (**Figure**

2c). In nonglaucomatous control eyes, neither NBI-74330 nor AMD-3100 had any effect on IOP.

CXCR3 antagonist improved TM function and reduced TC apoptosis in a rat model of glaucoma. Investigations were conducted in order to study mechanisms involved in the NBI-74330-related decrease in IOP. AH outflow was measured by *in vivo* fluorophotometry (Jones and Maurice, 1966; Yablonski et al., 1978) (**Figure 3a**) and the trabecular aqueous outflow evaluated by fluorescent microsphere injection and *ex vivo* confocal imaging of TMs (De Kater et al., 1989; Lu et al., 2008; Zhang et al., 2009) (**Figure 3b,c,d**). Interestingly, we observed a decrease in AH outflow along with a decrease in the TM filtering surface in hypertensive eyes compared to controls one month after the surgical procedure. Such a decrease in trabecular outflow facility is similar to what is observed during hypertensive POAG in humans. In our model, AH outflow impairment was significantly reversed in NBI-74330-treated eyes compared to vehicle-treated controls. Moreover, trabecular filtering surface, namely percent effective filtration length (PEFL), was also significantly improved by NBI-74330 treatment. In parallel, rat TM tissues were assessed for cellularity and apoptosis by immunohistofluorescence and TUNEL-labeling. Inflammatory cell infiltration was absent in the TM of glaucoma eyes one month after the surgery as revealed by a lack of either anti-CD45 or anti-CD11b reactive cells. In contrast, TC apoptosis was significantly increased in glaucoma eyes compared to normotensive control eyes. The apoptosis was reversed in glaucoma eyes treated with NBI-74330 compared to untreated glaucoma eyes. These data together suggested that blocking CXCR3 may lower experimentally induced OHT by restoring the TM filtering function and by protecting TC from apoptosis.

Human glaucomatous TCs produced SDF-1(5-67). It has been reported that a truncated form of CXCL12, SDF-1(5-67), binds to CXCR3 (Vergote et al., 2006). Western blot analysis of unstimulated human glaucomatous TCs, using a polyclonal anti-SDF-1(5-67) neoepitope-specific antibody, (**Figure 4a,b**) identified SDF-1(5-67). Incubation (24-h) with MMP inhibitors batimastat (100 nM) or TIMP-1 (0.5 nM) significantly reduced the amount of SDF-1(5-67), confirming that it originated from MMP activity produced by TCs. Dysregulation and overexpression of TGF- β 2 and TNF- α are associated with POAG (Tripathi et al., 1994; Sawada et al., 2010).

Interestingly, 24-h incubation with TNF- α (50 ng/mL) or with TGF- β (10 ng/mL) increased the production of SDF-1(5-67) by TCs. TNF- α and TGF- β also increased TC expression of full length CXCL12 as assessed by RT-PCR (2.2 ± 0.05 and 1.9 ± 0.06 fold over control for TNF- α and TGF- β stimulations, respectively, $P < 0.05$) and by FCM (1.44 ± 0.16 and 1.33 ± 0.28 normalized fluorescence intensity for TNF- α and TGF- β stimulations respectively, $P < 0.05$).

CXCL12 and SDF-1(5-67) induced internalization of CXCR4 and CXCR3, respectively. To further confirm that CXCL12 and its cleaved form were acting *via* two different receptors as previously reported in the brain, we assessed cell membrane expression of CXCR4 and CXCR3, using FCM, after stimulation with either CXCL12 or SDF-1(5-67). We observed that a 6-h stimulation with exogenous CXCL12 (10 ng/mL) downregulated cell surface expression of CXCR4, whereas a similar stimulation with exogenous SDF-1(5-67) reduced the cell surface membrane expression of CXCR3 (**Figure 4c**). In contrast, TC expression of CXCR7, an additional CXCL12 receptor, was not affected by either CXCL12 or by SDF-1(5-67), (1 ± 0.2 , 1.2 ± 0.1 , and 0.95 ± 0.05 for normalized mean fluorescence intensity in unstimulated, CXCL12- and SDF-1(5-67)-stimulated cells, respectively).

CXCL12 protected TCs from apoptotic stress whereas SDF-1(5-67) induced apoptosis. In POAG, TC apoptosis is known to be involved in TM degeneration, which was reproduced in our animal model of elevated IOP (**Figure 3**). The effect of CXCL12 and its cleaved form on *in vitro* TC viability were tested using a previously described model of toxic-induced apoptosis (Hamard et al., 2003). Briefly, TCs were exposed for 15 min to 0.01% BAC and after 24-h incubation in medium containing various concentrations of CXCL12 or SDF-1(5-67) were evaluated for (**Figure 5a,b**) apoptosis by microplate cytofluorometry and normalized to the cell viability (Borenfreund and Puerner, 1985; Hamard et al., 2003). As shown in **Figure 5a**, BAC induced a 2.5-fold increase in apoptosis. Addition of CXCL12 (10 ng/mL) blunted the deleterious effect of BAC, whereas SDF-1(5-67) (10 ng/mL) potentiated this apoptotic effect on TCs. Both the protective effect of CXCL12 and the deleterious effect of SDF-1(5-67) were concentration-dependent, with a maximal effect observed at 10 ng/mL (**Figure 5b**).

SDF-1(5-67) induced apoptosis via CXCR3 and induced OHT in rat eyes. To determine if CXCR4 and CXCR3 mediate the protective and apoptotic properties of CXCL12 and SDF-1(5-67), we investigated the influence of highly selective receptor antagonists. Blockade of CXCR4 with AMD3100 (1 μ M) inhibited the protective effect of CXCL12 and induced apoptosis, mimicking the apoptotic effect of SDF-1(5-67) (**Figure 5c**). I-TAC/CXCL11, a ligand for CXCR3 and CXCR7, had no effect on TC apoptosis (1.04 ± 0.12 , 1.11 ± 0.10 , and 1.03 ± 0.14 fold over control for a 24-h incubation with CXCL11 at 1ng/mL, 10 ng/mL, and 100 ng/mL respectively) confirming that the protective effect of CXCL12 was mediated by CXCR4. In contrast, selective blockade of CXCR3 with NBI-74330 (1 μ M) reversed the apoptotic effects of SDF-1(5-67) (10 ng/mL). To further confirm that SDF-1(5-67)-related apoptosis was mediated by CXCR3, exogenous CXCL10 (IP-10), a known ligand for CXCR3, was tested in this cell model. A 24-h incubation with CXCL10 (10 ng/mL) induced cell apoptosis that was prevented by blocking CXCR3 with NBI-74330. SDF-1(5-67)-related apoptosis correlated with an overexpression of active caspase-3 which was also decreased by antagonism of CXCR3 (**Figure 5d**). Finally SDF-1(5-67) was tested for its ability to modify IOP *in vivo*. Ten normal rats were injected with either SDF-1(5-67) (100 ng/mL, 100 μ L) or vehicle in only one eye. SDF-1(5-67) induced a significant OHT which remained elevated during 3 days (**Figure 5e**).

DISCUSSION

POAG represents “the beginning of the end” as it often results from a previous long-term IOP elevation, and constitutes an irreversible RGC loss causing visual impairment or even blindness. OHT is the first risk factor for both the development and the progression of POAG (Sommer, 1989), so the current therapeutic strategy is mainly based on reducing IOP. TM degeneration has largely been demonstrated as the main cause of aqueous outflow resistance responsible for abnormally elevated IOP in POAG (Tektas and Lütjen-Drecoll, 2009). It resembles age-related TM degeneration including ECM remodelling and TC loss (Alvarado et al., 1984; Rohen et al., 1984; Grierson and Howes, 1987; Hamard et al., 2002). Primary mechanisms causing such a degeneration, however, are still unknown, so the antiglaucoma therapies does not target the initial trabecular pathology. In other words, the current treatment focuses on the consequence of TM degeneration, *i.e.* OHT, but not on the cause. Several recent data have demonstrated that chemokines are not only involved

in inflammatory/immune processes but also in the regulation of tissue microenvironment as well as in degenerative disorders. In this study, we address the involvement of a balance between the full length chemokine CXCL12 and its truncated form SDF-1(5-67) in the regulation of IOP by modulating TC apoptosis *via* chemokine receptors CXCR4 and CXCR3. We describe the successful use *in vivo* of a non-peptide selective antagonist of CXCR3 to reduce OHT and prevent RGC loss in an animal model of glaucoma, establishing this chemokine receptor as a new specific therapeutic target to prevent the initial trabecular degeneration involved in POAG.

We reported that CXCL12, CXCR3, and CXCR4 are expressed in human TM samples of POAG patients as well as in a human glaucomatous TC line. In the eye, CXCL12 mRNA has been previously detected in TCs using gene microarrays (Zhao et al., 2004); CXCR4 has been investigated in the retina and in the cornea (Crane et al., 2000; Bourcier et al., 2003; Bhutto et al., 2006) but not in the TM; no data are available upon the expression of CXCR3 in ocular tissue. TCs play a crucial role in trabecular function and IOP regulation because of their phagocytosis activity and their ability to produce extracellular matrix components (Hernandez et al., 1987; Sherwood et al., 1988). We thus decided to test recently developed chemokine receptor antagonists in a rat model of experimentally elevated IOP in order to check the putative involvement of CXCR3 and CXCR4 in OHT. We performed episcleral vein cauterization (EVC) in rat eyes which has lead to a stable OHT for months and to RGC apoptosis, as previously described (Garcia-Valenzuela et al., 1995; Danias et al., 2006; Urcola et al., 2006; Yu et al., 2006; Park et al., 2008). Local ophthalmic treatment with AMD-3100, a non-peptide selective antagonist of CXCR4, had no effect on IOP. On the contrary, NBI-74330, a non-peptide selective antagonist of CXCR3, induced a dose-dependent decrease in IOP in glaucomatous eyes along with a decrease in RGC apoptosis. NBI-74330 has been described as a powerful and selective antagonist for CXCR3 in human and rodent cells (Medina et al., 2004; Heise et al., 2005; Jopling et al., 2007; Verzijl et al., 2008). It was used *in vivo* to reduce atherosclerosis plaque formation in mice (van Wanrooij et al., 2008). To our knowledge, this is the first study reporting the successful use of NBI-74330 in glaucoma eyes for the treatment of abnormally elevated IOP.

We sought to determine the mechanisms involved in NBI-74330-related decrease in IOP in our animal model. We performed *in vivo* fluorophotometry in order to measure the AH outflow (Jones and Maurice, 1966; Yablonski et al., 1978) and ocular injection of fluorescent microspheres combined with confocal TM imaging to evaluate the trabecular AH filtration (Zhang et al., 2009; Lu et al., 2008). Until today, there is still a lack of accurate and validated animal models for POAG. Nevertheless, we used a rat model of glaucoma induced by EVC because it shares a lot of similarities with that of human POAG: (i) it induces long-term elevated IOP by reducing AH outflow without surgically damaging the TM with saline solution or LASER; (ii) no difference in the anterior segment anatomy have been observed between this animal model and the human POAG eye (Nissirios et al., 2008); and (iii) the sustained elevated IOP is associated with nerve fiber layer defects and RGC apoptotic loss as observed in human POAG (Yu et al., 2006). We reported a decrease in the AH outflow of glaucomatous eyes compared to nonglaucomatous controls together with a decrease in the trabecular AH filtration, suggesting that long-term OHT in such a model was due to late and stable trabecular dysfunction occurring after the initial vein obstruction. Significantly, we reported that ophthalmic treatment with NBI-74330 in glaucomatous eyes enhanced AH outflow through an increase in the trabecular filtering surface. At cellular level, we observed an increase in TC apoptosis in our rat model of glaucoma similarly to what is observed in POAG in humans (Baleriola et al., 2008). We reported that NBI-74330 reduced such a pathological trabecular apoptosis compared to untreated glaucomatous eyes. It is noted that no inflammatory cell infiltration was found in rat TMs one month after the surgery, further confirming that NBI-74330 acted directly on TCs. These data together suggest that blocking CXCR3 *in vivo* lowers IOP by restoring the TM function and preserving TCs from apoptosis.

The proteolytic processing of chemokines is one of the regulatory mechanisms for their activity, and MMPs have been reported to be deeply involved in TM degeneration in POAG (Alexander and Acott, 2001; Hosseini et al., 2006; Acott and Kelley, 2008). It has been recently demonstrated that MMP cleavage of CXCL12 yields a toxic truncated form, SDF-1(5-67), causing direct apoptosis *via* CXCR3 (Zhang et al., 2003; Vergote et al., 2006). We assessed glaucomatous TC production of this truncated form of CXCL12 using specific anti-SDF-1(5-67) antibody. We observed a basal expression of SDF-1(5-67) which was reduced by MMP inhibitors,

10

further confirming that SDF-1(5-67) originates from MMP activity. Interestingly, TNF- α and TGF- β , both cytokines known to be overexpressed in POAG (Tripathi et al., 1994; Sawada et al., 2010), increased the production of CXCL12 and SDF-1(5-67). Some authors reported an overexpression of CXCL12 induced by either IL-1 β in astrocytes (Peng et al., 2006) or by TNF- α in human osteoblasts and fibroblasts (Hosokawa et al., 2005; Jung et al., 2006), whereas TGF- β had various effects depending on the cell line.

In vitro, we reported a non-immune constitutive autocrine function of CXCL12 in TCs *via* its classical receptor CXCR4, as previously described in the brain (Pujol et al., 2005). Indeed CXCL12 downregulated CXCR4 membrane expression in TCs, as in other cells (Marchese and Benovic, 2001; Busillo and Benovic, 2007). We demonstrated that physiological concentrations of CXCL12 protect TCs against apoptosis by activating CXCR4. Such a protective effect was reversed when blocking CXCR4 with AMD-3100. Some data already reported a direct protective role of the full length CXCL12 in meningioma (Barbieri et al., 2006) and in a primary neuronal cell line (Khan et al., 2008), without involving any other inflammatory cells. Recently, another chemokine receptor, CXCR7, has been identified as a new additional receptor for CXCL12 (Burns et al., 2006; Thelen and Thelen, 2008; Maksym et al., 2009). In TCs, we observe a very low expression of CXCR7 which was not influenced by exposure to CXCL12; I-TAC/CXCL11, a reported ligand for CXCR7, was further unable to influence TC viability. In contrast, we observed that SDF-1(5-67) induces TC apoptosis through CXCR3 and activation of caspase-3. Blockade of CXCR3 with NBI-74330 inhibited such an apoptotic effect. The involvement of CXCR3 in TC apoptosis was further confirmed by the use of IP-10/CXCL10, a cognate ligand for CXCR3, that mimicked the apoptotic effect of SDF-1(5-67) in TCs. Consistent with this, the interaction between CXCL10 and CXCR3 has been reported to mediate apoptosis in endothelial cells (Romagnani et al., 2001; Yang et al., 2004), and in neuronal cells in a caspase-3-dependent manner (Sui et al., 2006). SDF-1(5-67) and CXCL10 have been reported to share common features in their domains involved in CXCR3 binding (Booth et al., 2002). Last, we reported that subconjunctival injections of SDF-1(5-67) in rat healthy eyes induced an increase in IOP. However, the transient effect of SDF-1(5-67) as well as a significant OHT variability between rats suggests that other factor(s) may be implicated in such an IOP elevation.

In clinical practice, progressive therapeutic inefficacy marked by insufficient control of IOP associated with progression of RGC degeneration is often observed in POAG, leading to the need to combine two or more treatments to temporarily halt disease progression (Kass et al., 2002). Several mechanisms should be raised to explain such a treatment failure. In addition to a progressive loss of efficacy of the active antiglaucoma compound, namely tachyphylaxis, one logical cause could be the natural history of the trabecular pathology that could keep on worsening over time. Glaucoma-related TC loss is known to develop through apoptosis, which appears to be characteristic of POAG (Baleriola et al., 2008). It could be influenced by cytokines, MMPs, or oxidative stress (De La Paz and Epstein, 1996; Sacca et al., 2007; Fernandez-Durango et al., 2008). Here we originally propose that the chemokine CXCL12 plays a crucial role in the TM pathophysiology during POAG (**Figure 6**): (i) CXCL12 acts as a protective chemokine in an autocrine CXCL12/CXCR4 signaling; (ii) cytokine- and MMP-related overexpression and processing of CXCL12 into SDF-1(5-67) inhibits CXCR4 activation and induces apoptosis *via* CXCR3, leading to TM dysfunction and OHT; and (iii) CXCR3 can be blocked *in vivo* by a local ophthalmic treatment with a non-peptide selective antagonist in order to lower the abnormally elevated IOP by protecting TC from apoptosis in an animal model of glaucoma. Other chemokine systems should play a role in the TM homeostasis, inflammation and/or function, such as IL-8, CCL2 and CXCL6 that were recently detected in the TM (Shifera et al., 2010).

Intensive research on the pathogenesis of POAG is expected to advance our understanding in order to develop effective therapy (Ferrer, 2006; Fan and Wiggs, 2010; Izzotti et al., 2010). Our data originally suggest that proteolytic cleavage of a chemokine could deregulate the TM function by inducing TC apoptosis as observed in POAG. Current antiglaucoma treatment is still not curative because it does not treat the initial TM degeneration responsible for OHT and glaucoma. Here we propose that *in situ* blockade of the chemokine receptor CXCR3 could constitute a new therapeutic strategy to lower IOP by directly targeting the causal trabecular degeneration. Our study opens new therapeutic avenues focusing on chemokines and chemokine receptors in glaucoma.

METHODS

Antibodies and reagents. Recombinant human CXCL12 (7.8 kDa), TNF- α (17.5 kDa), TGF- β 2 (12.8 kDa), CXCL10 (8.7kDa) and TIMP-1 (20.6 kDa) were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). CXCL10 and CXCL19 were obtained from Peprotech (Rocky Hill, NJ) Exogenous CXCL12 and truncated SDF-1(5-67) (7.4 kDa) were synthesized by F. Balleux (Institut Pasteur, Lille, France). NBI-74330, a non-peptide antagonist of CXCR3, was synthesized using previously reported protocols (44,45). AMD-3100, a non-peptide antagonist of CXCR4 (Medina et al., 2004; Heise et al., 2005) was synthesized by Orga-Link (Gif-sur-Yvette, France). Batimastat was a gift from E. Gabison and S. Menashi (CNRS UMR 7149, University of Paris 12, Créteil, France). Cell antigens (Ag) were detected in TCs using the following antibodies (Ab): mouse IgG1 anti-human CXCL12 mAb (1:200, clone 79018, R&D Systems), mouse IgG2B anti-human CXCR4 mAb (1:200, clone 44716, R&D Systems), mouse IgG1 anti-human CXCR3 mAb (1:200, clone 49801, R&D Systems), anti-caspase 3 (clone 92-605, BD Biosciences), secondary antibodies Alexa Fluor488 goat anti-mouse IgG (1:500, Molecular Probes, Montluçon, France), and FITC-conjugated goat anti-mouse Fab (1:500, DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Rat TM were assessed for inflammatory cell infiltration using primary rabbit anti-CD45 pAb (1:100, ab10558, Abcam, Cambridge, MA) and mouse anti-rat CD11b mAb (1:200, ab8879, Abcam). Anti-SDF-1(5-67) (1:100) was a generous gift from C. Overall (University of Alberta, Edmonton, Canada), and anti-CXCR7 (1:200) was given by M. Thelen (Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona, Switzerland). Isotype-matched antibodies from R&D Systems were used as negative controls.

Human trabecular meshwork (TM) specimens and human glaucomatous trabecular cell (TC) line. Human TMs were obtained from 15 patients undergoing surgical trabeculectomy for POAG. All patients included in the study presented a POAG diagnosed at least 1 year before and presented no other ocular pathology or systemic disease. Experiments were conducted in the Clinical Investigation Centre for Ocular Surface Pathology (Centre Hospitalier National d'Ophthalmologie des Quinze-Vingts, Paris, France) in accordance with the Declaration of Helsinki, Scotland amendment, 2000. Ethics committee approval was obtained (INSERM-DHOS CIC, 503) and all patients signed the informed consent form before surgery.

The human glaucomatous TC line HTM3 was a gift from A. Clark (Alcon Laboratories, Fort Worth, TX). The transformation characteristics and procedures were previously reported (Pang et al., 1994). TCs were routinely cultured in standard humidified 5% CO₂ atmosphere in serum-free Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 4 mM L-glutamine, 10% fetal bovine serum, and 50 µg/mL gentamicin. For passages, monolayers were rinsed with PBS, dislodged by trypsinization (0.25% trypsin, 0.02% EDTA), then cultured from an initial concentration of 60,000 cells/mL. For IF, TCs were grown on 22-mm glass cover-slips, then dried and fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min. All cells were used at passage 10 to 20.

Animal model. Male 8-week-old Long-Evans rats weighing 300–350 g were used. Animals were kept in pathogen-free conditions with food and water available *ad libitum* and housed in a 12-h light/12-h dark cycle. Ocular integrity was checked using the slit lamp biomicroscope. The surgical model of elevated IOP was induced in the right eye of each rat by cauterization of three episcleral veins after conjunctival dissection, as previously reported (Garcia-Valenzuela et al., 1995) under general anesthesia (intraperitoneal injection of ketamine 75 mg/kg and xylazine 10 mg/kg). The left eyes underwent conjunctival dissection only as controls. After the surgery, the animals were maintained for a 21-day period and monitored for IOP three times a week using a handheld tonometer (TonoLab, Medtronic, Jacksonville, FL, USA) without sedation. Animals presenting low or instable IOP were then excluded, and all experiments were carried out one month at least after the surgery. All experiments were conducted in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology for the Use of Animals in Ophthalmic research.

Animal experiments. For evaluation of the effect of non-peptide antagonists on IOP, forty animals presenting stable elevated IOP were included and randomly divided into four equal groups: in both eyes, ten rats received one subconjunctival injection of AMD3100 (1 µM, 100 µL), ten received a single injection of NBI74330 (1 µM, 100 µL), ten received one injection of NBI74330 followed by a second one 4 days after, and ten rats received the vehicle only. IOP was monitored every two days by an independent person *i.e.* who was blind to the treatment. At the end of the experiments, animals were euthanized and the eyes were immediately removed,

fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in an optimal cutting-temperature compound (OCT, Tissue-Tek, Miles Inc, Bayer Diagnostic, Puteaux, France) and cut into 15- μ m cryosections.

For the dose study, twenty animals presenting stable elevated IOP were randomly divided into four equal groups to receive either both NBI-74330 injections (100 μ L) at three different concentrations (0.01 μ M, 0.1 μ M, and 1 μ M) or the vehicle only. IOPs were averaged from days 6, 8, and 10.

For the evaluation of AH outflow, twenty animals presenting stable elevated IOP were randomly divided into two equal groups to receive either NBI-74330 injections (1 μ M, 100 μ L) or the vehicle only. AH outflow was assessed at day 8 using *in vivo* fluorophotometry (Jones and Maurice, 1966; Yablonski et al., 1978). Briefly, 1 μ L fluorescein was injected using 33G needle into the anterior chamber under general anesthesia. One hour after, AH decrease in anterior chamber fluorescence has been recorded *in vivo* for 30 minutes using Micron III fluorescent imaging device (Phoenix research laboratories, San Ramon, CA) and ImageJ software (NIH). Mean fluorescence (F) intensities were normalized to F(0) and drawn in semi-log graphs as a function of time in order to calculate the AH outflow depending on the curve slope. To label the hydrodynamic patterns of trabecular outflow passage, ocular perfusion of fluorescent microsphere was performed as previously described (Zhang et al., 2009). Briefly, the ocular anterior chamber was exchanged with red-fluorescent microspheres in BSS (0.1 μ m, 0.02%v/v, Invitrogen) using double 30-gauge needle infusion, and followed by a 30-minute perfusion at the IOP measured before death. Anterior chamber contents were washed with BSS and eyes were immediately removed and fixed in 4% paraformaldehyde for 15 minutes. Anterior segments were quadrisectioned and flat-mounted on coverglass after exposing the TM by gently moving the iris tissue. TM was observed under laser confocal microscope using 20x objective lens regardless of the presence of microsphere accumulation. An index of the trabecular filtration, namely trabecular percent effective filtration length (PEFL) (Lu et al., 2008), was calculated as the length ratio of the zones wherein tracer accumulated to the total length of the inner wall in at least 8 images per eye.

To study the effect of SDF-1(5-67) on IOP, subconjunctival injections with either SDF-1(5-67) (100 ng/mL, 100 μ L) or PBS only (100 μ L) were performed in ten normal rats. The IOP was measured every 12 hours using Tonolab tonometer during five days.

Quantitative RT-PCR. Assays-on-demand primers for human CXCL12 (ID Hs00171022m1), human CXCR4 (ID Hs00607978s1), human CXCR3 (ID Hs00171041m1) and S18 (ID Hs99999901s1) were purchased from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Total mRNA was isolated from cultured TCs using the NucleoSpin RNA II extraction kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), and was then reverse-transcribed (TaqMan Reverse Transcription Reagents, Applied Biosystems). CXCL12, CXCR3, CXCR4 and S18 mRNAs levels were determined using RT 7300 (Applied Biosystems). Relative quantitation of target genes was calculated according to the comparative Ct method, *i.e.* normalized to an endogenous control S18 gene and relative to a calibrator after calculating the efficiency coefficient. mRNA in human TM tissue was extracted using the NucleoSpin RNA XS kit (Macherey-Nagel), then conditioned and determined following the same above-described procedure. The results are presented as the inverse of the normalized Ct value (InvCt) or as the relative fold change using the DeltaCt method compared to unstimulated control. A negative control was routinely used omitting mRNA from the RT reaction mixture.

Immunohistofluorescence (IF). Nonspecific Ab binding was blocked with normal goat serum or with fetal bovine serum in PBS/0.1% Triton for 60 min, washed three times, then incubated overnight at 4°C with primary Ab. After three more washings, cells/tissues were counterstained with secondary fluorescent Ab for 2 h at room temperature. Specimens were finally washed three times in PBS, incubated in propidium iodide for 3 min (Sigma-Aldrich, France) or in DAPI for 1 min, and mounted in gel mounting medium. Isotype-matched mAbs were used as controls for each sample and each primary Ab. Samples were analyzed using a laser confocal microscope (E800, PCM2000, Nikon, Champigny-sur-Marne, France).

TUNEL labelling. A terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) assay (Roche Diagnostics, Meylan, France) was performed to detect apoptosis in rat eye cryosections following the manufacturer's instructions. Controls were done in each eye using a 10-min pretreatment with DNase or omitting the transferase solution as positive or negative control, respectively. Specimens were mounted in aqueous mounting medium with DAPI to be further analyzed using light

epifluorescence microscopy. TUNEL-labelled TCs were observed and counted in five 0.01-mm² fields per sample in order to compare apoptotic TC density between groups. TUNEL-labelled RGCs were counted in five fields per sample and normalized to the observed retinal inner layer length.

Flow cytometry (FCM). TCs (120,000 per well) were plated in six-well plates (Costar, Cambridge, MA, USA) and grown to 80% confluence. The cells were cultured in complete medium for 24 h and subsequently incubated with serum-free DMEM, supplemented CXCL12, or SDF-1(5-67) for 12 h. Cells were carefully detached, suspended in PBS containing 1% BSA, blocked with normal rabbit serum, and stained with primary Ab for 1 h on ice, washed three times with cold 1%-BSA PSB, and then stained for 30 min with FITC-conjugated goat anti-mouse fAb (1:500). Negative controls were incubated with isotype-matched primary Abs. Cells were fixed in 0.5% paraformaldehyde and analyzed on a FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). The results are reported as the percentage of the gated cells or as mean fluorescence intensity (MFI) compared to isotypic controls.

ELISA. The amount of CXCL12 released into TC supernatants was measured by an in-house ELISA (ref. DY350, R&D Systems). Cells were cultured and stimulated as described above, and supernatants were isolated after centrifugation. 96-well microtitre plates were coated overnight with mouse anti-CXCL12 capture mAb then nonspecific binding was blocked for 2 h with 1% BSA in PBS. Duplicate samples (100 µL) of cell supernatants or serial dilutions of standards of human recombinant CXCL12 were incubated for 2 h, washed, then incubated with goat anti-CXCL12 mAb for 2 h, followed by 20-min incubation with HRP-conjugated streptavidin. Reaction product was detected using color reagent (ref. DY999, R&D Systems). Optical density was read (450–570 nm, SpectraFluor, TECAN, Switzerland) and averaged from ten measurements per well. The limit of sensitivity for this assay was 15 pg/mL.

Western blot analysis. Protein extracts were prepared from TCs (120,000 per well) grown to 80% confluence in six-well plates. The cells were fed with medium for 24 h, then incubated for 24 h with supplemented DMEM only or with specific inhibitors, detached and homogenized in cell lysis buffer. Equal amounts of proteins were separated on 4%-12% Tris-Glycine gel (Novex, Invitrogen), transferred to

nitrocellulose, and probed overnight with anti-SDF-1(5-67) neoepitope polyclonal antibody (1:100, 30-min preincubated with CXCL12 to improve the antibody specificity) as previously described (Vergote et al., 2006). Primary Ab binding was revealed using HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:3000, Vector, AbCys, Paris, France) for 1 hour and developed with ECL Plus detection reagents (GE healthcare, Orsay, France). β -actin (Abcam) was used as internal control. Signal intensity of anti-SDF-1(5-67) binding was quantitated using ImageJ software and normalized to β -actin detection. Exogenous CXCL12 and SDF-1(5-67) were used as negative and positive controls respectively in order to ensure the antibody specificity.

Cell viability assays. The effects of CXCL12 and SDF-1(5-67) on the cell proliferation and apoptosis were analyzed in a cellular model of toxicity induced by a pretreatment with benzalkonium chloride (BAC), as previously described (Hamard et al., 2003). Briefly, 80% confluent TCs were incubated in PBS with 0.01% BAC for 15 min in order to induce approximately 50% apoptosis. Cells were washed with PBS, incubated in free medium (control) or with CXCL12, SDF-1(5-67), and inhibitors during a 24-h recovery period. Microplate cytofluorometry was performed on Sapphire Microplate reader (Tecan Instruments, Lyon, France) in 96-well microtitre plates: neutral red staining (Fluka, Ronkonkoma, NY, USA) was used to evaluate membrane integrity that closely correlates with cell viability (Borenfreund and Puerner, 1985); apoptosis was quantified with the nuclear dye Hoechst33258 (Hoechst, Germany) combined with propidium iodide in order to exclude necrosis (Debbasch et al., 2001). Apoptosis was calculated as the ratio of apoptotic cells on the total cell viability, and expressed as relative fold changes compared to control.

Statistical analysis. All data are reported as means \pm SEM and represent at least three independent experiments. Analysis was performed using NCSS software (NCSS, Kaysville, UT). Data were checked for variance and distribution in order to perform the adequate parametric/nonparametric test for the comparisons. A value of $P < 0.05$ was considered to be significant.

Acknowledgements. This work was supported by INSERM grants for AD, DG, JD, WR and CB, by UPMC grant for IC, and by NIH grant for JKH (AI058256). We thank Christopher Overall and Amanda Starr (University of Alberta, Edmonton, Canada) for

providing us the anti-SDF-1(5-67) antibody, and Marcus Thelen (Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona, Switzerland) for the anti-CXCR7 antibody. We also thank Nathalie Rouach (INSERM U840, Collège de France, Paris, France) for her helpful advice. The authors have no conflicting financial interest.

REFERENCES

- Acott, T.S., and Kelley, M.J. 2008. Extracellular matrix in the trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 86:543-561.
- Alexander, J.P., and Acott, T.S. 2001. Involvement of protein kinase C in TNF α regulation of trabecular matrix metalloproteinases and TIMPs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2831-2838.
- Alvarado, J., Murphy, C., and Juster, R. 1984. Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and non-glaucomatous normals. *Ophthalmology* 91:564-579.
- Baleriola, J., García-Feijoo, J., Martínez-de-la-Casa, J.M., Fernández-Cruz, A., de la Rosa, E.J., and Fernández-Durango, R. 2008. Apoptosis in the trabecular meshwork of glaucomatous patients *Mol Vis* 14:1513-1516.
- Barbieri, F., Bajetto, A., Porcile, C., Pattarozzi, A., Massa, A., Lunardi, G., Zona, G., Dorcaratto, A., Ravetti, J.L., Spaziant, R., et al. 2006. CXC receptor and chemokine expression in human meningioma: SDF1/CXCR4 signaling activates ERK1/2 and stimulates meningioma cell proliferation. *Ann N Y Acad Sci* 1090:332-343.
- Bhutto, I.A., McLeod, D.S., Merges, C., Hasegawa, T., and Luty, G.A. 2006. Localisation of SDF-1 and its receptor CXCR4 in retina and choroid of aged human eyes and in eyes with age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 90:906-910.
- Booth, V., Keizer, D.W., Kamphuis, M.B., Clark-Lewis, I., and Sykes, B.D. 2002. The CXCR3 binding chemokine IP-10/CXCL10: structure and receptor interactions. *Biochemistry* 41:10418-10425.
- Borenfreund, E., Puerner, J.A. 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 24:119-124.
- Bourcier, T., Berbar, T., Paquet, S., Rondeau, N., Thomas, F., Borderie, V., Laroche, L., Rostene, W., Haour, F., and Lombet, A. 2003. Characterization and functionality of CXCR4 chemokine receptor and SDF-1 in human corneal fibroblasts. *Mol Vis* 9:96-102.
- Burns, J.M., Summers, B.C., Wang, Y., Melikian, A., Berahovich, R., Miao, Z., Penfold, M.E., Sunshine, M.J., Littman, D.R., Kuo, C.J., et al. 2006. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* 203:2201-2213.
- Busillo, J.M., and Benovic, J.L. 2007. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta* 1768:952-963.
- Cedrone, C., Mancino, R., Cerulli, A., Cesareo, M., and Nucci, C. 2008. Epidemiology of primary glaucoma: prevalence, incidence, and blinding effects. *Prog Brain Res* 173:3-14.

- Crane, I.J., Wallace, C.A., McKillop-Smith, S., and Forrester, J.V. 2000. CXCR4 receptor expression on human retinal pigment epithelial cells from the blood-retina barrier leads to chemokine secretion and migration in response to stromal cell-derived factor 1 alpha. *J Immunol* 165:4372-4378.
- Curnow, S.J., Wloka, K., Faint, J.M., Amft, N., Cheung, C.M., Savant, V., Lord, J., Akbar, A.N., Buckley, C.D., Murray, P.I., et al. 2004. Topical glucocorticoid therapy directly induces up-regulation of functional CXCR4 on primed T lymphocytes in the aqueous humor of patients with uveitis. *J Immunol* 172:7154-7161.
- Danias, J., Shen, F., Kavalarakis, M., Chen, B., Goldblum, D., Lee, K., Zamora, M.F., Su, Y., Brodie, S.E., Podos, S.M., et al. 2006. Characterization of retinal damage in the episcleral vein cauterization rat glaucoma model. *Exp Eye Res* 82:219-228.
- De Kater, A.W., Melamed, S., Epstein, D.L. 1989. Patterns of aqueous humor outflow in glaucomatous and nonglaucomatous human eyes. A tracer study using cationized ferritin. *Arch Ophthalmol* 107:572-576.
- De La Paz, M.A., and Epstein, D.L. 1996. Effect of age on superoxide dismutase activity of human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:1849-1853.
- Denis, P., Lafuma, A., and Berdeaux, G. 2008. Costs and persistence of alpha-2 adrenergic agonists versus carbonic anhydrase inhibitors, both associated with prostaglandin analogues, for glaucoma as recorded by The United Kingdom General Practitioner Research Database. *Clin Ophthalmol* 2:321-329.
- Dieu-Nosjean, M.C., Vicari, A., Lebecque, S., and Caux, C. 1999. Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J Leukoc Biol* 66:252-262.
- Donzella, G.A., Schols, D., Lin, S.W., Esté, J.A., Nagashima, K.A., Maddon, P.J., Allaway, G.P., Sakmar, T.P., Henson, G., De Clercq, E., and Moore, J.P. 1998. AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med* 4:72-77.
- Estes, J.D., Thacker, T.C., Hampton, D.L., Kell, S.A., Keele, B.F., Palenske, E.A., Druey, K.M., and Burton, G.F. 2004. Follicular dendritic cell regulation of CXCR4-mediated germinal center CD4 T cell migration. *J Immunol* 173:6169-6178.
- Fan, B.J., and Wiggs, J.L. 2010. Glaucoma: genes, phenotypes, and new directions for therapy. *J Clin Invest* 120:3064-3072.
- Fernández-Durango, R., Fernández-Martínez, A., García-Feijoo, J., Castillo, A., de la Casa, J.M., García-Bueno, B., Pérez-Nievas, B.G., Fernandez-Cruz, A., and Leza, J.C. 2008. Expression of nitrotyrosine and oxidative consequences in the trabecular meshwork of patients with primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:2506-2511.
- Ferrer, E. 2006. Trabecular meshwork as a new target for the treatment of glaucoma. *Drug News Perspect* 19:151-158.

- Garcia-Valenzuela, E., Shareef, S., Walsh, J., and Sharma, S.C. 1995. Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 61:33-44.
- Grierson, I., and Howes, R.C. 1987. Age-related depletion of the cell population in the human trabecular meshwork. *Eye* 1:204-210.
- Hamard, P., Valtot, F., Sourdille, P., Bourles-Dagonet, F., and Baudouin, C. 2002. Confocal microscopic examination of trabecular meshwork removed during ab externo trabeculectomy. *Br J Ophthalmol* 86:1046-1052.
- Hamard, P., Blondin, C., Debbasch, C., Warnet, J.M., Baudouin, C., and Brignole, F. 2003. In vitro effects of preserved and unpreserved antiglaucoma drugs on apoptotic marker expression by human trabecular cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 241:1037-1043.
- Heise, C.E., Pahuja, A., Hudson, S.C., Mistry, M.S., Putnam, A.L., Gross, M.M., Gottlieb, P.A., Wade, W.S., Kiankarimi, M., and Schwarz, D. 2005. Pharmacological characterization of CXC chemokine receptor 3 ligands and a small molecule antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 313:1263-1271.
- Hernandez, M.R., Weinstein, B.I., Schwartz, J., Ritch, R., Gordon, G.G., and Southern, A.L. 1987. Human trabecular meshwork cells in culture: Morphology and extracellular matrix components. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28:1655-1660.
- Hosokawa, Y., Hosokawa, I., Ozaki, K., Nakae, H., Murakami, K., Miyake, Y., and Matsuo, T. 2005. CXCL12 and CXCR4 expression by human gingival fibroblasts in periodontal disease. *Clin Exp Immunol* 141:467-474.
- Hosseini, M., Rose, A.Y., Song, K., Bohan, C., Alexander, J.P., Kelley, M.J., and Acott, T.S. 2006. IL-1 and TNF induction of matrix metalloproteinase-3 by c-Jun N-terminal kinase in trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:1469-1476.
- Izzotti, A., Saccà, S.C., Longobardi, M., and Cartiglia, C. 2010. Mitochondrial damage in the trabecular meshwork of patients with glaucoma. *Arch Ophthalmol* 128:724-730.
- Jones, R.F., Maurice, D.M. 1966. New methods of measuring the rate of aqueous flow in man with fluorescein. *Exp Eye Res* 5:208-220.
- Jopling, L.A., Watt, G.F., Fisher, S., Birch, H., Coggon, S., and Christie, M.I. 2007. Analysis of the pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship of a small molecule CXCR3 antagonist, NBI-74330, using a murine CXCR3 internalization assay. *Br J Pharmacol* 152:1260-1271.
- Jung, Y., Wang, J., Schneider, A., Sun, Y.X., Koh-Paige, A.J., Osman, N.I., McCauley, L.K., and Taichman, R.S. 2006. Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone* 38:497-508.
- Kass, M.A., Heuer, D.K., Higginbotham, E.J., Johnson, C.A., Keltner, J.L., Miller, J.P., Parrish, R.K. 2nd, Wilson, M.R., and Gordon, M.O. 2002. The Ocular

- Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 120:701-713.
- Khan, A., Greenman, J., and Archibald, S.J. 2007. Small molecule CXCR4 chemokine receptor antagonists: developing drug candidates. *Curr Med Chem* 14:2257-2277.
- Khan, M.Z., Brandimarti, R., Shimizu, S., Nicolai, J., Crowe, E., and Meucci, O. 2008. The chemokine CXCL12 promotes survival of postmitotic neurons by regulating Rb protein. *Cell Death Differ* 15:1663-1672.
- Lapidot, T., Dar, A., and Kollet, O. 2005. How do stem cells find their way home? *Blood* 106:1901-1910.
- Li, G., Luna, C., Liton, P.B., Navarro, I., Epstein, D.L., and Gonzalez, P. 2007. Sustained stress response after oxidative stress in trabecular meshwork cells. *Mol Vis* 13:2282-2288.
- Li, M., and Ransohoff, R.M. 2008. Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology. *Prog Neurobiol* 84:116-131.
- Lu, Z., Overby, D.R., Scott, P.A., Freddo, T.F., Gong, H. 2008. The mechanism of increasing outflow facility by rho-kinase inhibition with Y-27632 in bovine eyes. *Exp Eye Res* 86:271-281.
- Maksym, R.B., Tarnowski, M., Grymula, K., Tarnowska, J., Wysoczynski, M., Liu, R., Czerny, B., Ratajczak, J., Kucia, M., and Ratajczak, M.Z. 2009. The role of stromal-derived factor-1--CXCR7 axis in development and cancer. *Eur J Pharmacol* 625:31-40.
- Marchese, A., and Benovic, J.L. 2001. Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem* 276:45509-45512.
- McQuibban, G.A., Butler, G.S., Gong, J.H., Bendall, L., Power, C., Clark-Lewis, I., and Overall, C.M. 2001. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem* 276:43503-43508.
- McQuibban, G.A., Gong, J.H., Tam, E.M., McCulloch, C.A., Clark-Lewis, I., and Overall, C.M. 2000. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 289:1202-1206.
- Medina, J., Collins, T., Johnson, M., Li, A.R., Fu, Z., Liu, J., Marcus, A., Tonn, G., Schall, T., and Ye, Q. 2004. Discovery and Development of a CXCR3 antagonist T487 as therapy for Th1-mediated immune disorders. *29th National Medicinal Chemistry Symposium*.
- Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., et al. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410:50-56.

- Nagasawa, T., Kikutani, H., and Kishimoto, T. 1994. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2305-2309.
- Nissirios, N., Chanis, R., Johnson, E., Morrison, J., Cepurna, W.O., Jia, L., Mittag, T., and Danias, J. 2008. Comparison of anterior segment structures in two rat glaucoma models: an ultrasound biomicroscopic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:2478-2482.
- Pang, I.H., Shade, D.L., Clark, A.F., Steely, H.T., and DeSantis, L. 1994. Preliminary characterization of a transformed cell strain derived from human trabecular meshwork. *Curr Eye Res* 13:51-63.
- Park, H.Y., Lee, N.Y., Kim, J.H., and Park, C.K. 2008. Intraocular pressure lowering, change of antiapoptotic molecule expression, and neuroretinal changes by dorzolamide 2%/timolol 0.5% combination in a chronic ocular hypertension rat model. *J Ocul Pharmacol Ther* 24:563-571.
- Peng, H., Erdmann, N., Whitney, N., Dou, H., Gorantla, S., Gendelman, H.E., Ghorpade, A., and Zheng, J. 2006. HIV-1-infected and/or immune activated macrophages regulate astrocyte SDF-1 production through IL-1beta. *Glia* 54:619-629.
- Quigley, H.A., and Broman, A.T. 2006. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 90:262-267.
- Rohen, J.W., Lutjen-Drecoll, E., Flugel, C., Meyer, M., and Grierson, I. 1993. Ultrastructure of the trabecular meshwork in untreated cases of primary open-angle glaucoma. *Exp Eye Res* 56:683-692.
- Romagnani, P., Annunziato, F., Lasagni, L., Lazzeri, E., Beltrame, C., Francalanci, M., Uguccioni, M., Galli, G., Cosmi, L., Maurenzig, L., et al. 2001. Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J Clin Invest* 107:53-63.
- Rostene, W., Kitabgi, P., and Parsadaniantz, S.M. 2007. Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nat Rev Neurosci* 8:895-903.
- Sacca, S.C., Izzotti, A., Rossi, P., and Traverso, C. 2007. Glaucomatous outflow pathway and oxidative stress. *Exp Eye Res* 84:389-399.
- Sawada, H., Fukuchi, T., Tanaka, T., and Abe, H. 2010. Tumor necrosis factor-alpha concentrations in the aqueous humor of patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:903-906.
- Sherwood, M.E., Richardson, T.M., and Epstein, D.L. 1988. Phagocytosis by trabecular meshwork cells: Sequence of events in cats and monkeys. *Exp Eye Res* 46:881-895.
- Shifera, A.S., Trivedi, S., Chau, P., Bonnemaision, L.H., Iguchi, R., and Alvarado, J.A. 2010. Constitutive secretion of chemokines by cultured human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 91:42-47.

- Sommer, A. 1989. Intraocular pressure and glaucoma. *Am J Ophthalmol* 107:186-188.
- Son, B.R., Marquez-Curtis, L.A., Kucia, M., Wysoczynski, M., Turner, A.R., Ratajczak, J., Ratajczak, M.Z., and Janowska-Wieczorek, A. 2006. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells* 24:1254-1264.
- Sui, Y., Stehno-Bittel, L., Li, S., Loganathan, R., Dhillon, N.K., Pinson, D., Nath, A., Kolson, D., Narayan, O., and Buch, S. 2006. CXCL10-induced cell death in neurons: role of calcium dysregulation. *Eur J Neurosci* 23:957-964.
- Tektas, O.Y., and Lütjen-Drecoll, E. 2009. Structural changes of the trabecular meshwork in different kinds of glaucoma. *Exp Eye Res* 88:769-775.
- Thelen, M., and Thelen, S. 2008. CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? *J Neuroimmunol* 198:9-13.
- Tripathi, R.C., Li, J., Chan, W.F., and Tripathi, B.J. 1994. Aqueous humor in glaucomatous eyes contains an increased level of TGF-beta 2. *Exp Eye Res* 59:723-727.
- Urcola, J.H., Hernandez, M., and Vecino, E. 2006. Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp Eye Res* 83:429-437.
- Valenzuela-Fernandez, A., Planchenault, T., Baleux, F., Staropoli, I., Le-Barillec, K., Leduc, D., Delaunay, T., Lazarini, F., Virelizier, J.L., Chignard, M., et al. 2002. Leukocyte elastase negatively regulates Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 binding and functions by amino-terminal processing of SDF-1 and CXCR4. *J Biol Chem* 277:15677-15689.
- van Wanrooij, E.J., de Jager, S.C., van Es, T., de Vos, P., Birch, H.L., Owen, D.A., Watson, R.J., Biessen, E.A., Chapman, G.A., van Berkel, T.J., et al. 2008. CXCR3 antagonist NBI-74330 attenuates atherosclerotic plaque formation in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:251-257.
- Vergote, D., Butler, G.S., Ooms, M., Cox, J.H., Silva, C., Hollenberg, M.D., Jhamandas, J.H., Overall, C.M., and Power, C. 2006. Proteolytic processing of SDF-1alpha reveals a change in receptor specificity mediating HIV-associated neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19182-19187.
- Verzija, D., Storelli, S., Scholten, D.J., Bosch, L., Reinhart, T.A., Streblov, D.N., Tensen, C.P., Fitzsimons, C.P., Zaman, G.J., Pease, J.E., et al. 2008. Noncompetitive antagonism and inverse agonism as mechanism of action of nonpeptidergic antagonists at primate and rodent CXCR3 chemokine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 325:544-555.
- Yablonski, M.E., Zimmerman, T.J., Waltman, S.R., Becker, B. 1978. A fluorophotometric study of the effect of topical timolol on aqueous humor dynamics. *Exp Eye Res* 25:135-142.

Yang, J., and Richmond, A. 2004. The angiostatic activity of interferon-inducible protein-10/CXCL10 in human melanoma depends on binding to CXCR3 but not to glycosaminoglycan. *Mol Ther* 9:846-855.

Yu, S., Tanabe, T., and Yoshimura, N. 2006. A rat model of glaucoma induced by episcleral vein ligation. *Exp Eye Res* 83:758-770.

Zhang, K., McQuibban, G.A., Silva, C., Butler, G.S., Johnston, J.B., Holden, J., Clark-Lewis, I., Overall, C.M., and Power, C. 2003. HIV-induced metalloproteinase processing of the chemokine stromal cell derived factor-1 causes neurodegeneration. *Nat Neurosci* 6:1064-1071.

Zhang, Y., Toris, C.B., Liu, Y., Ye, W., Gong, H. 2009. Morphological and hydrodynamic correlates in monkey eyes with laser induced glaucoma. *Exp Eye Res* 89:748-756.

Zhao, X., Ramsey, K.E., Stephan, D.A., and Russell, P. 2004. Gene and protein expression changes in human trabecular meshwork cells treated with transforming growth factor-beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:4023-4034.

FIGURES AND LEGENDS

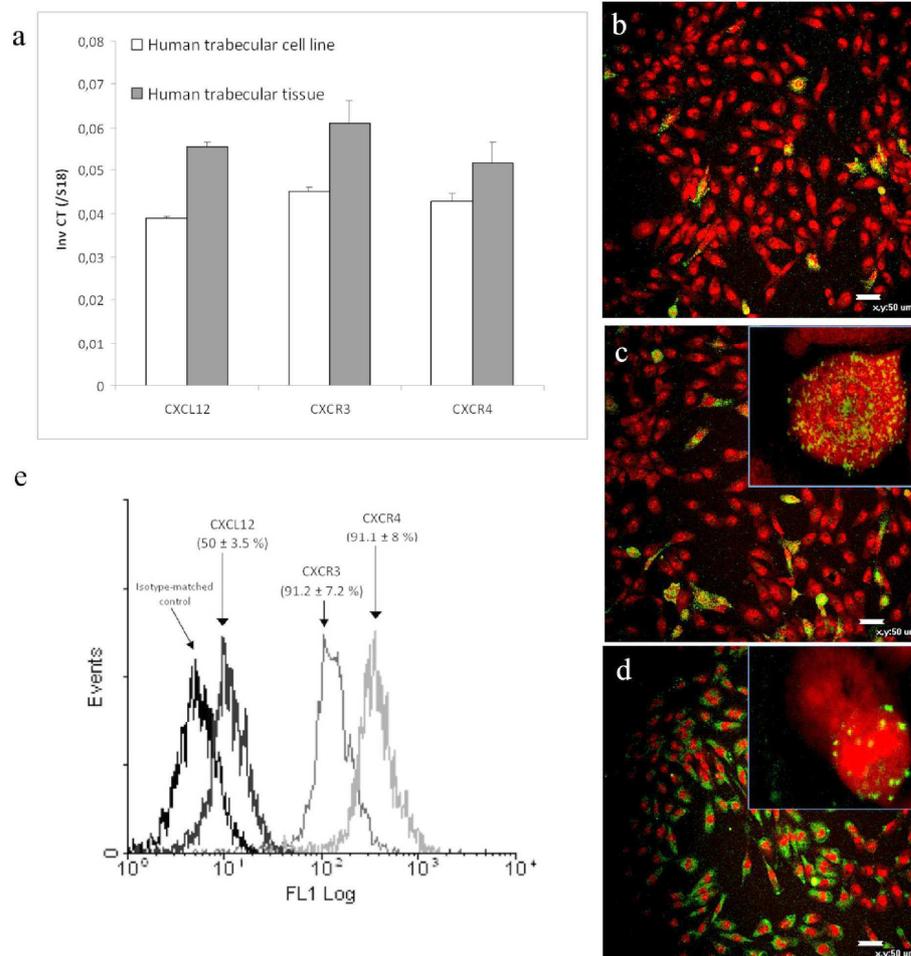


Figure 1. Human glaucomatous trabecular tissue and trabecular cell line express CXCL12, CXCR3 and CXCR4. (a) RT-PCR analysis of CXCL12, CXCR3 and CXCR4 mRNAs (expressed as the inverse of the Ct normalized to S18) in both glaucomatous TMs (n=15) and TC line. (b, c, d) CXCL12 (b), CXCR3 (c) and CXCR4 (d) were detected by immunohistofluorescence in unstimulated cultured TC line HTM3 (magnification $\times 200$, scale bar: 50 μm). CXCR3 and CXCR4 appear as multiple membrane hot spots (inserts, $\times 800$). (e) FACS analysis of CXCL12, CXCR3 and CXCR4 in the TC line. Results are expressed as the percentage of gated cells over the control (and mean fluorescence intensity \pm SEM). Representative data, from at least three independent experiments, are depicted.

??

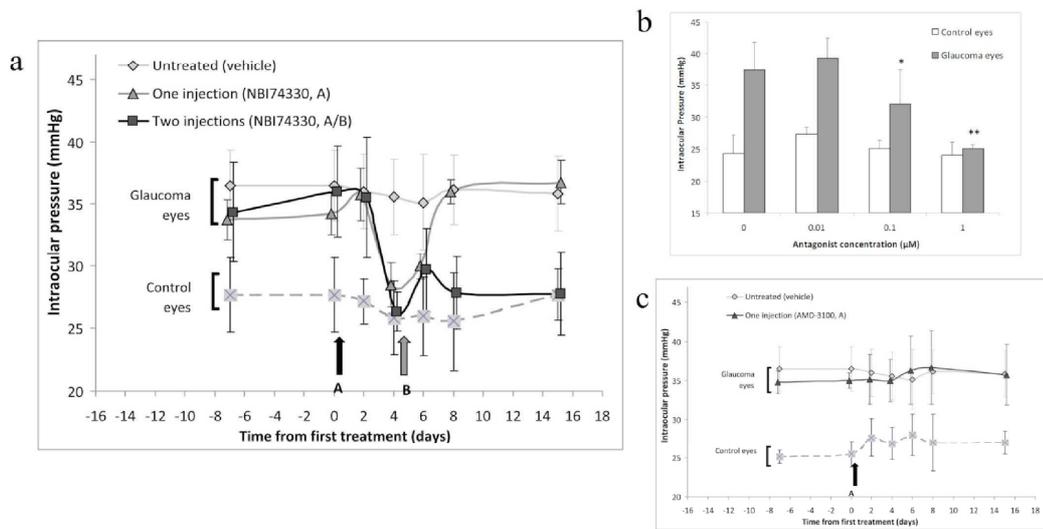


Figure 2. *In vivo* blockade of CXCR3 lowered the intraocular pressure in a rat model of glaucoma. An animal model of surgically-induced elevated IOP was used to evaluate the *in vivo* effects of NBI-74330 and AMD3100, selective non-peptide antagonists for CXCR3 and CXCR4 respectively. **(a)** Single subconjunctival injection of NBI-74330 (1 μM, 100 μL, n=10) induced a significant decrease in IOP in glaucomatous eyes 3 days after the injection, which returned to abnormally elevated values at day 6. The IOP remained significantly low up to day 15 when a second injection was performed (n=10). **(b)** NBI-74330 reduced the IOP in glaucomatous eyes (n=20) in a dose-dependent manner. Mann-Whitney U-test: *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ relative to vehicle-treated eyes. **(c)** AMD3100 did not affect the IOP in glaucomatous eyes nor in non-glaucomatous controls (n=20).

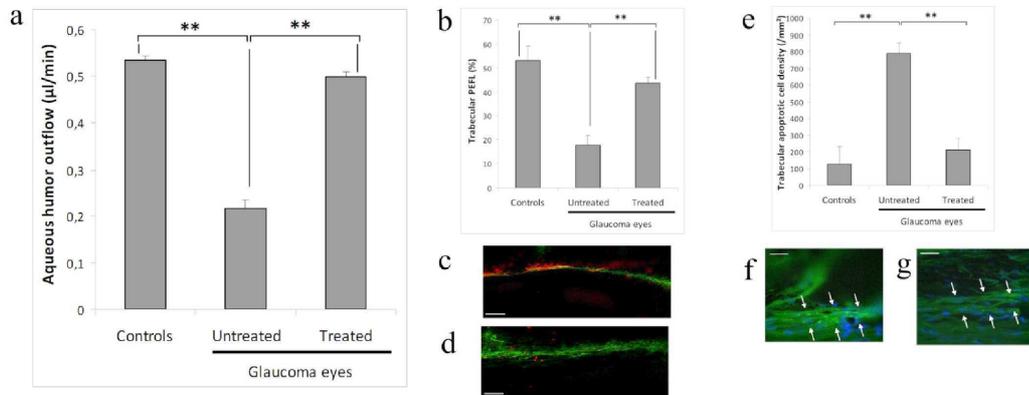


Figure 3. *In vivo* treatment with a CXCR3 antagonist increased aqueous humor outflow and trabecular filtration, and decreased trabecular cell apoptosis in an animal model of glaucoma. Aqueous humor outflow (AHO), trabecular percent effective filtration length (PEFL), and trabecular cell apoptosis were evaluated in normal eyes (n=20) and in glaucomatous eyes (n=20) treated with or without NBI-74330 (1 μ M, 100 μ L, 2 subconjunctival injections). **(a)** AHO was improved in NBI-74330-treated glaucomatous eyes (n=20) compared to vehicle-treated glaucomatous eyes. **(b)** Trabecular PEFL, an index for trabecular outflow, was evaluated using red-fluorescent microsphere injection (n=20). Trabecular PEFL was increased in NBI-74330-treated glaucomatous eyes compared to vehicle-treated eyes. **(c, d)** Red-fluorescent tracer accumulation into the TM was higher in (a) NBI-74330-treated glaucomatous eyes than in (d) vehicle-treated glaucomatous eyes as assessed by confocal microscopy (Magnification \times 200, scale bar: 100 μ m). **(e)** NBI-74330 treatment significantly reduced the amount of apoptotic TCs in glaucomatous eyes. **(f, g)** High density of green-fluorescent TUNEL-labeled apoptotic cells was detected in TM cryosections of (f) vehicle-treated glaucomatous eyes (arrows) compared to (g) NBI-74330-treated glaucomatous eyes (Magnification \times 400, scale bar: 50 μ m). All data in bar graphs are presented as mean \pm SEM. ANOVA: **, $P < 0.01$.

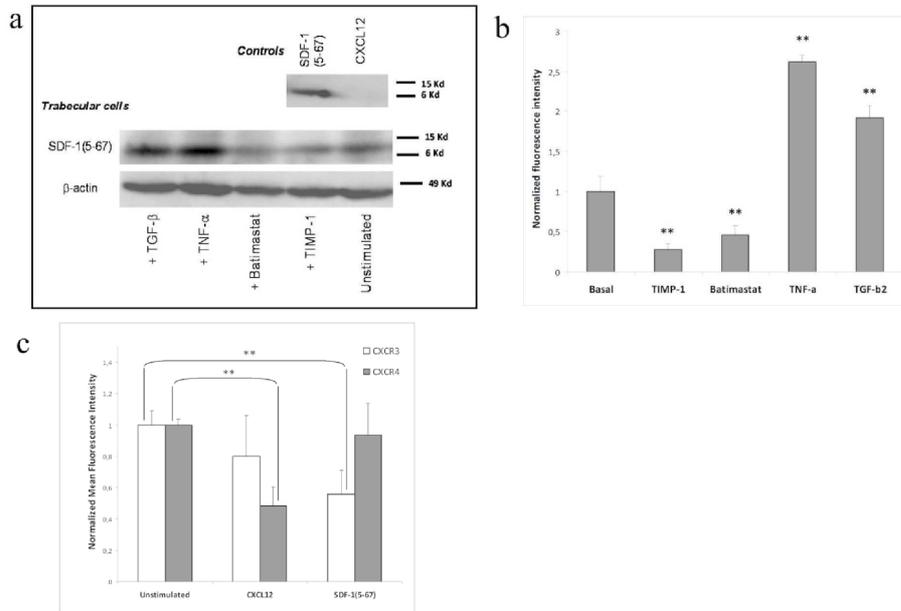


Figure 4. Glaucomatous trabecular cells produced SDF-1(5-67). CXCL12 and SDF-1(5-67) induce the internalization of either CXCR4 or CXCR3. (a) Western blot analysis of trabecular cells, using an anti-SDF-1(5-67) neoepitope-specific antibody. Exogenous CXCL12 and SDF-1(5-67) were used as negative and positive controls respectively (top membrane). SDF-1(5-67) was detected in unstimulated trabecular cells (right-hand column). Incubation (24-h) with MMP inhibitors batimastat (100 nM) or TIMP-1 (0.5 nM) reduced the amount of SDF-1(5-67) (center columns). Incubation (24-h) with TNF-α (50 ng/mL) or with TGF-β (10ng/mL) increased levels of SDF-1(5-67) (left-hand columns). (b) Quantitation of Western blots presented in (a). (c) Cell surface expression of CXCR3 and CXCR4 was assessed using flow cytometry. Stimulation (6-h) with exogenous CXCL12 (10 ng/mL) decreased cell surface levels of CXCR4, whereas similar stimulation with SDF-1(5-67) downregulated the levels of CXCR3. All data in bar graphs are presented ± SEM. ANOVA: **, $P < 0.01$.

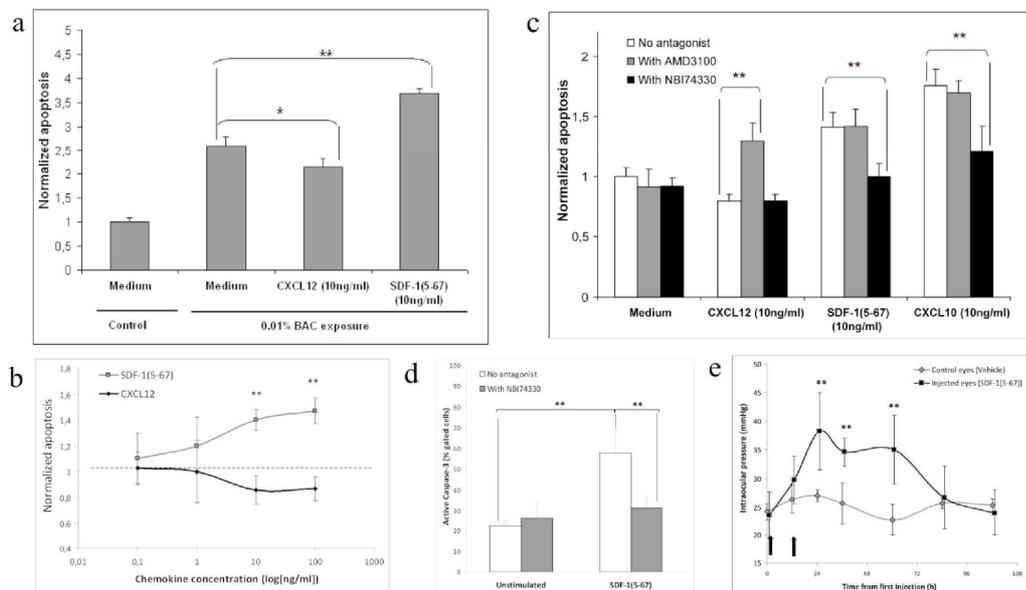


Figure 5. CXCL12 protected trabecular cells against apoptosis *via* CXCR4. SDF-1(5-67) induced apoptosis *in vitro* *via* CXCR3 and increased the intraocular pressure *in vivo* in rat eyes. (a) Benzalkonium chloride(BAC)-induced apoptosis (measured by microplate cytofluorometry, normalized to cell viability and to unstimulated controls) was reduced in TCs when recovering with CXCL12 (10 ng/ml, 24 h), whereas apoptosis increased when recovering with SDF-1(5-67). **(b)** CXCL12 and SDF-1(5-67) modulated the BAC-induced TC apoptosis in a dose-dependent manner. **(c)** Blockade of CXCR4 using AMD3100 (1 μ M) reversed the protective effect of CXCL12 against BAC-induced apoptosis whereas blockade of CXCR3 using NBI-74330 (1 μ M) inhibited the apoptotic effect of SDF-1(5-67). CXCL10, another ligand for CXCR3, induced apoptosis that was also inhibited by NBI-74330. **(d)** Active caspase-3 (expressed as the percentage of gated cells using FCM) was overexpressed in TCs exposed to SDF-1(5-67) (10 ng/mL) compared to unstimulated cells. Preincubation with NBI-74330 (1 μ M) inhibited this effect. All data are presented \pm SEM. n=3-5. ANOVA: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$. **(e)** *In vivo*, two subconjunctival injections of SDF-1(5-67) (100 ng/mL, 100 μ L) induced a transient elevation of the IOP in rat eyes (n=10). Mann-Whitney U-test: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

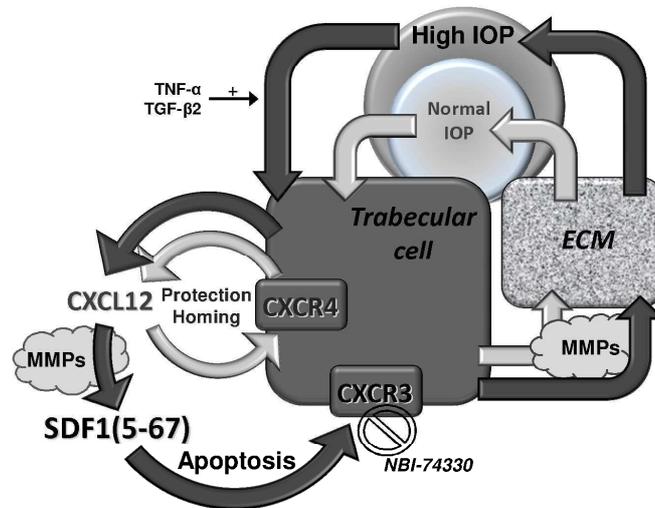


Figure 6. Model depicting the role of the chemokine CXCL12 and receptors CXCR4 and CXCR3 in the pathophysiology of the trabecular meshwork in glaucoma. The primary function of the trabecular meshwork (TM), *i.e.* trabecular cells (TCs) and extracellular matrix (ECM), is to regulate the intraocular pressure (IOP). Light gray cycle (physiological conditions): CXCL12 acts in an autocrine manner as a protective chemokine *via* CXCR4. Dark gray cycle (ocular hypertension): the trabecular cells overexpress CXCL12 that is cleaved into SDF-1(5-67) inducing apoptosis and TM dysfunction *via* CXCR3. *In vivo* blockade of CXCR3 using a non-peptide selective antagonist (NBI-74330) decreases the abnormally elevated IOP by restoring TM function and reducing TC apoptosis.

2.2 Article2

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Allergy and Clinical Immunology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: CX3CL1/Fractalkine is involved in conjunctival immune cell trafficking during ocular surface inflammation.

Article Type: Original Article

Section/Category: Mechanisms of Allergy and Clinical Immunology

Keywords: benzalkonium chloride; chemokine; chemotaxis; conjunctiva; CX3CR1; macrophage; ocular toxicity

Corresponding Author: Dr. Alexandre Denoyer, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: INSERM 968 Institut de la Vision

First Author: Alexandre Denoyer, MD, PhD

Order of Authors: Alexandre Denoyer, MD, PhD; David Godefroy; Julie Frugier, PhD-; Luisa Riancho; Isabelle Célérier, PhD-; Françoise Baudouin, M.D, PhD.; William Rostène, PhD.; Christophe Baudouin, M.D, PhD.

Manuscript Region of Origin: FRANCE

Abstract: Background: Benzalkonium chloride (BAC) is still a commonly used preservative in ophthalmic medications despite its deleterious effects on the ocular surface, including conjunctival inflammation and immune cell infiltration. Inappropriate expression of the chemokine CX3CL1 has been reported to act on inflammatory conditions in immune and allergic diseases by attracting CX3CR1-bearing cells. The role of CX3CL1 in conjunctival immune cell trafficking during normal and pathological conditions has never been investigated before.

Objective: We sought to study the CX3CL1 axis during BAC-induced conjunctival inflammation.

Methods: CX3CL1/CX3CR1 expression was assessed in the conjunctiva of BAC-exposed patients by impression cytology (IC), and in conjunctival epithelial cell (CEC) line using RT-PCR, flow cytometry, and immunofluorescence. Migration assay was performed with primary leukocytes to determine the chemotactic properties of CECs related to CX3CL1 expression. Clinical and in vitro findings were supplemented by an animal study on BAC-induced inflammatory cell migration to the conjunctiva in CX3CR1-deficient mice.

Results: CX3CL1 was found to be overexpressed in the conjunctiva of BAC-exposed patients compared to unexposed controls. In vitro, BAC induced CEC overexpression of CX3CL1 in a dose- and time-dependent manner. BAC-stimulated CECs attracted CD3+, CD56+, and CD14+ leukocytes through the CX3CL1/CX3CR1 interaction. In vivo, BAC-induced F4/80+ macrophage infiltration into the conjunctiva was significantly reduced in CX3CR1-deficient mice compared to CX3CR1+/+ controls.

Conclusion: We demonstrate that CX3CL1 epithelial cell expression plays a role in inflammatory cell trafficking in the conjunctiva, and that BAC acts directly on the ocular inflammation by modulating the interactions between epithelial and immune cells through CX3CL1/CX3CR1.

CX3CL1/Fractalkine is involved in conjunctival immune cell trafficking during ocular surface inflammation.

Alexandre Denoyer ^{1,2}, MD, PhD-, David Godefroy¹, Julie Frugier¹, MD-, Luisa Riancho¹, Isabelle Célérier ⁴, MD-, Françoise Baudouin^{1,3}, MD, PhD, William Rostène¹, PhD, Christophe Baudouin^{1,2}, MD, PhD.

- 1) INSERM, U968; UPMC University Paris 06, UMR_S 968, Institut de la Vision; CNRS, UMR_7210, Paris, France.
- 2) Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts, Paris, France
- 3) Department of toxicology, Faculty of biological and pharmacological sciences, University René Descartes Paris 05, Paris, France.
- 4) INSERM, U872, Team 1, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France.

Corresponding author :

Alexandre Denoyer

INSERM UPMC, UMR_S968, Institut de la Vision, 17 rue Moreau, Paris, F-75012, France

Tel: + 33 153 462 572

alexandre.denoyer@gmail.com

Disclosure: the authors declare no financial interest.

Word count: 3435

Background: Benzalkonium chloride (BAC) is still a commonly used preservative in ophthalmic medications despite its deleterious effects on the ocular surface, including conjunctival inflammation and immune cell infiltration. Inappropriate expression of the chemokine CX3CL1 has been reported to act on inflammatory conditions in immune and allergic diseases by attracting CX3CR1-bearing cells. The role of CX3CL1 in conjunctival immune cell trafficking during normal and pathological conditions has never been investigated before.

Objective: We sought to study the CX3CL1 axis during BAC-induced conjunctival inflammation.

Methods: CX3CL1/CX3CR1 expression was assessed in the conjunctiva of BAC-exposed patients by impression cytology (IC), and in conjunctival epithelial cell (CEC) line using RT-PCR, flow cytometry, and immunofluorescence. Migration assay was performed with primary leukocytes to determine the chemotactic properties of CECs related to CX3CL1 expression. Clinical and *in vitro* findings were supplemented by an animal study on BAC-induced inflammatory cell migration to the conjunctiva in CX3CR1-deficient mice.

Results: CX3CL1 was found to be overexpressed in the conjunctiva of BAC-exposed patients compared to unexposed controls. *In vitro*, BAC induced CEC overexpression of CX3CL1 in a dose- and time-dependent manner. BAC-stimulated CECs attracted CD3+, CD56+, and CD14+ leukocytes through the CX3CL1/CX3CR1 interaction. *In vivo*, BAC-induced F4/80+ macrophage infiltration into the conjunctiva was significantly reduced in CX3CR1-deficient mice compared to CX3CR1^{+/+} controls.

Conclusion: We demonstrate that CX3CL1 epithelial cell expression plays a role in inflammatory cell trafficking in the conjunctiva, and that BAC acts directly on the ocular inflammation by modulating the interactions between epithelial and immune cells through CX3CL1/CX3CR1.

Clinical Implications: The present study opens new way to investigate ocular surface disorders by focusing on conjunctival expression of chemokines and chemokine-related conjunctival inflammation and immune cell trafficking.

Capsule summary: CX3CL1 conjunctival epithelial expression is involved in immune cell trafficking in the ocular surface. We demonstrate that a commonly used preservative in ophthalmic medication directly causes inflammation by modulating epithelial/immune cells interaction through CX3CL1.

Key words: benzalkonium chloride; chemokine; chemotaxis; conjunctiva; CX3CR1; macrophage; ocular toxicity.

Abbreviations

BAC: benzalkonium chloride

BSA: bovine serum albumin

CEC: conjunctival epithelial cell

DC: dendritic cell

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

FCM: flow cytometry

GFP: green-fluorescent protein

IC: impression cytology

IHF: Immunohistofluorescence

PBS: phosphate buffer saline

RT-PCR: real-time polymerase chain reaction

/body

Preservatives are commonly used in a wide range of chronically administered ophthalmic preparations including anti-allergy drugs, anti-glaucoma medications, as well as tear substitutes for dry eye disease. However, although providing useful antimicrobial properties, preservatives are known to adversely cause deleterious tissue damage adding to ocular surface inflammation[1,2]. Comparative surveys in patients treated for allergic conjunctivitis as well as for glaucoma reported a higher frequency of adverse reactions along with a decrease in compliance in groups receiving a preserved treatment compared to preservative-free groups[3-6]. Inflammatory and allergic ocular surface diseases result from different mechanisms that have not yet been completely elucidated[7]. However, today it has been validated that most of the adverse effects of preservatives result from toxicity and about 10% could be true allergy[8,9]. Benzalkonium chloride (BAC), which is one of the most widely used preservatives in ophthalmology, is a quaternary ammonium compound used at concentrations of 0.004–0.025% in multi-dose preparations. Several studies have demonstrated that BAC is responsible for ocular surface damage causing irritancy symptoms, treatment discontinuation, and iatrogenic dry eye disease[6,10]. BAC ocular toxicity adversely affects the ocular surface, *i.e.* both the cornea and conjunctiva, causing local inflammation, cell apoptosis, and epithelial barrier breakdown[11]. *In vitro* studies reported that BAC induces dose-dependent conjunctival cell apoptosis[12-15] associated with overexpression of cytokines such as TNF- α or IL-1 β [16]. Human and animal studies revealed that exposure to BAC-containing eye drops induced overexpression of inflammatory markers such as HLA-DR, ICAM-1 or Fas[17-20] along with conjunctival infiltration of neutrophils, T lymphocytes, and macrophages[21-24]. However, the mechanisms leading to this BAC-induced inflammatory cell accumulation at the ocular surface have not yet been elucidated. More precisely, it has never been determined whether this inflammatory cell infiltration could be attributed to BAC-modulated specific interactions between conjunctival epithelial cells (CEC) and immune cells or only to nonspecific inflammatory processes secondary to tissue and lacrimal damage.

Leukocyte migration to inflammatory sites is mainly regulated by chemokines following complex interactions depending on the *in situ* release of specific chemokines as well as on the expression pattern of the corresponding receptors in leukocytes. CX3CL1, also called fractalkine, is the sole member of the CX3C-chemokine subfamily and binds to its specific receptor CX3CR1[25,26]. After proteolytic cleavage, this membrane-bound glycoprotein assumes a soluble form that induces migration and activation of CX3CR1-bearing cells such as T cells, NKs, monocytes and monocyte-derived macrophages, and dendritic cells (DCs)[25-29]. Aside from its endothelial expression and its involvement in

atherosclerosis pathophysiology[30,31], CX3CL1 has been detected in epithelial cells from various tissues[32-34]. In allergic disease, CX3CL1 has been reported to play a role in allergic asthma/rhinitis and atopic dermatitis[35-37]. Development of knock-out mice as well as knock-in mice, in which a green-fluorescent protein (GFP) gene was inserted at the CX3CR1 locus, has improved the animal study of CX3CR1-mediated monocyte/monocyte-derived cell homing and turnover in several tissues, including the retina and the cornea[38-42].

Given both the chronic inflammatory changes associated with BAC-containing eye drop administration to the ocular surface and the role played by CX3CL1/CX3CR1 in leukocyte migration during inflammatory and allergic processes, we speculated that CX3CL1 could be involved in the conjunctival inflammation induced by BAC. Hence, we investigated the CX3CL1 conjunctival epithelial expression along with its consequences on immune cell infiltration in patients and in cell and animal models of BAC-induced toxicity.

METHODS

Patients and conjunctival impression cytology.

Twenty glaucomatous patients treated with BAC-preserved medication and 20 patients treated with BAC-free medication underwent clinical ocular examination and impression cytology (IC). Clinical evaluation of the conjunctiva was routinely assessed using the slit-lamp by scoring conjunctival hyperemia (range, 0–5), conjunctival epithelium damage using lissamine green staining[43] (range, 0–9), and tear break-up time using fluorescein. Experiments were conducted in the Clinical Investigation Centre for Ocular Surface Pathology (Centre Hospitalier National d’Ophtalmologie des Quinze-Vingts, INSERM-DHOS CIC 503, Paris, France) in accordance with the Declaration of Helsinki, Scotland amendment, 2000. Ethics committee approval was obtained from the Comité de Protection des Personnes (Ile de France V, agreement number 10793) and all the patients gave informed consent before the study. CEC imprints were collected as previously described[44,45].

Human conjunctival epithelial cell line.

IOBA-NHC cells, a spontaneously immortalized CEC line[46], were grown under standard conditions as previously described[12]. Cells from passages 20 to 30 were used in all experiments. Cells were seeded (80,000/ml) in six-well culture plates (TPP, Trasadingen, Switzerland) for RT-PCR, flow cytometry (FCM), and ELISA, or grown on 22-mm glass cover-slips for immunohistochemistry (IHC), fed with medium for 24 h, then stimulated with various concentrations of BAC in PBS for 15 min followed by 12-h culture in medium. TNF- α (50 ng/mL) was used as positive control. For quantitative RT-PCR, total mRNA was isolated from cultured TCs using the NucleoSpin RNA II extraction kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). For FCM, cells were gently dislodged by 0.05% EDTA, resuspended in PBS with 0.4% paraformaldehyde, and divided into 100,000 cell samples. Cells grown on glass cover-slips were dried and fixed in PBS with 4% paraformaldehyde before processing for IHC.

Animals.

Ten homozygous CX3CR1^{gfp/gfp} KI mouse strains on C57BL/6 background and their CX3CR1^{+/+} controls were generated as previously described[40,42]. Animals were kept in pathogen-free conditions with food and water available *ad libitum* and housed in a 12-h light/12-h dark cycle. All experiments were conducted in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology for the Use of Animals in Ophthalmic Research. Acute exposure to BAC was carried out by applying one drop of BAC solution (0.05%, 50 μ l

0.9% NaCl) in the right eye and one drop of the vehicle in the left control eye, 15 times at 5-min intervals, consistently with previously validated toxicological models[47,48]. Twelve hours later, mice were euthanized and the conjunctiva was carefully removed, fixed, and flat-mounted onto glass slides.

Flow cytometry.

Expression of HLA-DR, CX3CL1, and CX3CR1 in human IC and CEC line were assessed by FCM using FC 500-CXP flow cytometer (Beckman Coulter, Miami, FL). Samples were incubated for 1 h at room temperature with primary anti-HLA-DR antibody (1/50, clone TAL.1B5, DakoCytomation, Glostrup, Denmark), anti-CX3CL1 (1/200, clone 81506, R&D Systems), or anti-CX3CR1 MAb (1/500, clone 183-2, Imgenex, San Diego, CA) in PBS with 1% BSA followed by counterstaining with the corresponding fluorescein isothiocyanate-conjugated secondary antibody (DakoCytomation). Isotype-matched antibodies were used as negative controls. For each specimen, at least 1,000 cells per antibody were analyzed. The results were expressed as the percentage of positively gated cells.

ELISA

Concentration of released CX3CL1 was measured in cell supernatants by an in-house ELISA (DY365, R&D Systems). Cells were cultured and stimulated as described above. 96-well microtitre plates were coated overnight with mouse anti-CX3CL1 capture mAb then nonspecific binding was blocked for 2 h with 1% BSA in PBS. Duplicate samples (100 μ L) of cell supernatants or serial dilutions of standards of human recombinant CX3CL1 were incubated for 2 h, incubated with anti-CX3CL1 mAb for 2 h, followed by 20-min incubation with HRP-conjugated streptavidin. Reaction product was detected using color reagent. Optical density was read (450–570 nm, TECAN, Switzerland) and averaged from ten measurements per well. Sensitivity was 615 pg/mL.

Immunohistofluorescence.

Expression of CX3CL1 and CX3CR1 was also assessed by IHF in IOBA CECs. Cells were blocked for nonspecific binding with normal goat serum in PBS/0.1% Triton for 30 min, incubated at room temperature for 2 h with either anti-CX3CL1 (1/200, clone 25088, Abcam, Cambridge, MA) or anti-CX3CR1 (1/200, clone 8021, Abcam) primary antibody, then counterstained with secondary Alexa Fluor 488 antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA) for 1 h. Isotype-matched antibodies were substituted for primary as negative controls. Cells were mounted in aqueous mounting medium with propidium iodide to be further analyzed using light epifluorescence microscopy.

Characterization of inflammatory cell infiltration in mouse conjunctivas was assessed by IHF. Conjunctival flatmounts were incubated in 0.1% triton-X in PBS with 1% BSA for 30 min, incubated overnight at 4°C with primary antibodies – anti-CD3 (clone 17-A2), anti-CD11b (cloneM1/70), anti-NKG2D (clone191004), and anti-EMR1/F4/80 (clone521204) – purchased from R&D Systems, followed by counterstaining with the corresponding secondary Alexa Fluor 555 antibody (Invitrogen) in PBS with 10% mouse serum for 2 h. Specimens were mounted in aqueous mounting medium with DAPI and analyzed using a light epifluorescence microscope. Infiltrated cells in the superficial conjunctiva were counted in five 0.15-mm² fields (magnification ×200) per specimen and the results were reported as number of cells/mm².

Quantitative Real-Time PCR.

Primers for human CX3CL1 and CX3CR1 were designed and purchased from Eurogentec. mRNA was then reverse-transcribed (CyberGreen, Biorad). Relative quantitation of target genes was calculated according to the comparative Ct method, *i.e.*, normalized to an endogenous control S18 gene and relative to a calibrator after calculating the efficiency coefficient. The results are presented as the relative fold change using the DeltaCt method compared to unstimulated control. A negative control was routinely used omitting mRNA from the RT reaction mixture.

Chemotactic migration assay.

Primary blood leukocytes were isolated from heparinized venous blood (CTS Saint-Antoine, Paris) by one-step centrifugation on a Ficoll separating solution (Eurobio, France) and cultured for 24 h in DMEM with BSA. Non-adherent leukocytes were resuspended at 1,000,000 cells/mL, whereas adherent macrophages were harvested with 0.5% EDTA, and resuspended at 200,000 cells/mL for separate assays. Chemotaxis was assayed in a 6-well chemotaxis chamber through 5-µm and 8-µm pore-sized filters (Costar, Cambridge, MA, USA). One milliliter of cell suspension of nonadherent leukocytes or macrophages was preincubated for 30 min with or without neutralizing anti-CX3CR1 antibody and then was loaded onto the filter. The lower chamber contained medium only (control), unstimulated CECs, or CECs previously stimulated with BAC. The plates were incubated for 3 h. Nonadherent blood cells that migrated to the lower chamber were counted and characterized for their expression of CD45, CD3, CD14, and CD56 by FCM using direct multicolor immunostaining (Cyto-Stat6607073, 6603909, Beckman Coulter). In the macrophage migration assays, adherent cells that migrated to the bottom surface of the filter were stained with primary anti-CD14 counterstained with Alexa Fluor 488 secondary antibody and then

counted in ten fields ($\times 200$) per filter. The results are expressed as chemotactic index, *i.e.*, the ratio of blood cells on the lower side normalized to the control.

Statistical analysis.

All data are reported as means \pm SEM and represent at least three independent experiments. Data were controlled for normal distribution and analysis was performed using NCSS software (NCSS, Kaysville, UT) using the *t*-test and the ANOVA test for comparisons, and the Pearson coefficient for correlations. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Conjunctival CX3CL1/CX3CR1 expression and clinical inflammation in patients treated with BAC-containing eye drops.

We had previously demonstrated that BAC-preserved ophthalmic medication induces conjunctival inflammation along with an overexpression of inflammatory markers in human conjunctival epithelium[8,18]. In the present study, we assessed the conjunctival expression of CX3CL1, CX3CR1, and HLA-DR in patients receiving BAC-containing ophthalmic medication compared to patients treated with BAC-free eye drops using IC with FCM. CX3CL1, CX3CR1, and HLA-DR were detected at low levels in unexposed controls (**Fig. 1**). On the other hand, conjunctival epithelial cells from patients treated over the long term with BAC-preserved eye drops significantly overexpressed CX3CL1, but not CX3CR1, and also overexpressed HLA-DR compared to controls. The CX3CL1 level in BAC-exposed patients correlated positively with the conjunctival epithelium damage score as assessed by clinical examination (**Table 1**).

Basal and inducible expression of CX3CL1/CX3CR1 in cultured CECs.

RT-PCR, IHF, FCM, and ELISA were performed *in vitro* in a CEC line in order to assess the effect of BAC on chemokine/receptor expression. CX3CL1 but not CX3CR1 was detected by quantitative RT-PCR and IHF in unstimulated cells (**Fig. 2 A,B**). Similarly with what was observed in conjunctival cells from patient IC, stimulation with 0.01% BAC, as well as by TNF- α , induced overexpression of CX3CL1 only. Quantitation of the chemokine expression using FCM revealed that BAC significantly enhanced the total expression of CX3CL1 in a dose- and time-dependent manner (**Fig. 2 C,D**). Membrane expression of CX3CL1 was significantly enhanced 6 h after stimulation with BAC 0.01% and total cell expression was enhanced 6, 12 and 24 h after stimulation (**Fig. 2D**). In parallel, the concentration of soluble CX3CL1 into cell supernatant rapidly increased after 0.01% BAC stimulation as assessed by ELISA (**Fig. 2E**).

***In vitro* CX3CL1/CX3CR1-mediated leukocyte chemotaxis to CECs.**

We investigated the chemotactic effect of CX3CL1 from CECs on leukocyte migration by performing a transmigration assay. Unstimulated CECs did not show significant chemotactic properties compared to free medium. BAC-stimulated cells (0.01% BAC stimulation for 15 min, 12 h before the assay) attracted specific leukocyte subpopulations, including CD3⁺ CD56⁻ lymphocytes, CD14⁺ monocytes and CD56⁺ NK cells as assessed by FCM (**Fig. 3A**). Leukocyte preincubation with blocking anti-CX3CR1 antibody decreased

for half the migration of CD14⁺ and totally inhibited the CD56⁺ cell migration. CD3⁺ CD56⁻ cell migration was not statistically affected by blockade of CX3CR1. In the macrophage migration assay, unstimulated CECs did not significantly influence CD14⁺ cell migration compared to free medium (3-h migration), whereas BAC-stimulated CECs attracted adherent CD14⁺ macrophages (**Fig. 3B**). This migration was reduced by half when preincubating macrophages with anti-CX3CR1 antibody.

***In vivo* inflammatory cell infiltration in the conjunctiva in CX3CR1-deficient mice exposed to BAC.**

CX3CR1-deficient mice were used in order to complete our *in vitro* findings. Conjunctiva of transgenic mice and their controls were removed 12 h after being exposed to BAC and compared for inflammatory cell infiltration. Density of resident CX3CR1⁺ DCs was not different CX3CR1^{gfp/gfp} mice and their controls, nor between treated and control eyes (70.5 ± 19.1 cells/mm² and 50.9 ± 18.1 in control and BAC-exposed eyes of CX3CR1^{+/+}, respectively, ns; 65.4 ± 10.5 and 47.9 ± 12.9 in CX3CR1-deficient mice, ns). Few CD11b⁺ granulocytes, CD3⁺ lymphocytes, F4/80⁺ macrophages, and NK2GD⁺ NK cells were detected in unexposed conjunctiva of both CX3CR1^{+/+} and CX3CR1-deficient mice (**Fig. 4**). Exposure to BAC induced a significant conjunctival infiltration of CD11b⁺, CD3⁺, and F4/80⁺ cells in both groups. No statistical difference was found in CD11b⁺ and CD3⁺ cell infiltration between CX3CR1^{+/+} and CX3CR1-deficient mice. In contrast, the density of F4/80⁺ macrophages in BAC-exposed conjunctivas was lower in CX3CR1-deficient mice than in CX3CR1^{+/+}, suggesting macrophage migration depends on the CX3CL1/CX3CR1 interaction.

DISCUSSION

Chemokine CX3CL1/fractalkine is involved in the immune cell trafficking by attracting CX3CR1-bearing macrophages and cytotoxic lymphocytes[25-29]. Its overexpression by stromal and epithelial cells has been incriminated in several inflammatory diseases including atopic dermatitis, psoriasis, rheumatoid arthritis, or Sjögren syndrome[34,35,49,50]. Herein we demonstrate in a new way that epithelial synthesis of CX3CL1 is involved in conjunctival inflammatory cell trafficking. This is the first study to show that BAC, the most widely used preservative in ophthalmic preparations, enhances inflammatory cell migration to the conjunctiva by inducing an epithelial synthesis of a chemokine, thus demonstrating direct proinflammatory property of this type of compound in the eye.

IC with FCM is a simple, noninvasive *ex vivo* method recently used to quantitize cell markers expressed in the human ocular surface. We had previously developed this method in order to identify some inflammatory markers during chronic inflammatory ocular surface diseases including allergy, dry eye, and preservative-induced inflammation[8,45]. Our study originally revealed that IC with FCM detects a constitutive expression of CX3CL1 in the normal conjunctival epithelium. This basal epithelial expression has been reported in the tonsil, gut, small intestine, and skin[32,33], but not in the conjunctiva. In this way, CX3CL1 could be involved in the homing of resident immune cells, including monocyte-derived dendritic cells to the tissues, as previously studied in the cornea[39,41]. On the other hand, CX3CR1 was not detected in conjunctival ECs. Consistent with this, CX3CR1 has never been detected in other types of epithelial cells or tissues. In patients treated with BAC-containing eye drops, we had previously demonstrated an overexpression of inflammatory markers such as HLA-DR or ICAM-1, interleukins such as IL-8, and the chemokine receptors CCR4 and CCR5 aiming at discriminating TH1- from TH2-related inflammatory changes[18-20,45]. Interestingly, in BAC-exposed patients both CCR4 and CCR5 were found to be overexpressed, indicating the involvement of complex inflammatory processes in eyes exposed to BAC[51]. In the present study, CX3CL1 expression was significantly enhanced in BAC-exposed patients compared to unexposed controls, along with an overexpression of HLA-DR. It should be noticed that CX3CL1 epithelial expression closely correlated with conjunctival epithelial damage as assessed by clinical examination of the conjunctiva. Hence, we hypothesized that CX3CL1 could constitute a new marker of conjunctival inflammation and be a major factor in BAC ocular toxicity by directly influencing inflammatory cell migration and further inflammatory-mediated cytotoxicity to the fragile ocular surface structures.

In vitro, CECs were exposed to various concentrations of BAC and then assessed for their CX3CL1/CX3CR1 expression over time. We had previously developed this toxic cell model and demonstrated that BAC induces apoptosis in a dose-dependent manner[12]. Here we reported that BAC induced overexpression of CX3CL1 in a dose- and time-dependent manner. A recent *in vitro* study reported overexpression of TNF, IL-1, IL-10, and IL-12 in conjunctival cells exposed to BAC[16], but the expression of CX3CL1 in conjunctival cells had never been investigated. Interestingly, CX3CL1 is a unique chemokine that assumes both a transmembrane form and a soluble form, presenting the dual functions of an adhesion molecule and a chemoattractant. FCM as well as ELISA were performed to precise the dynamic expression of CX3CL1 by revealing rapid sorting to the cell membrane, as well as a rapid release into the cell supernatant. In order to define its effects on immune cell attraction, chemotaxis migration assay was carried out combining human blood leukocytes and CECs. We demonstrate that BAC-stimulated CECs significantly attract CD3+, CD14+, and CD56+ cells through the CX3CL1/CX3CR1 interaction. Consistent with this, CX3CR1 is known to be expressed in circulating lymphocytes, monocytes, and NKs[25-29]. Interestingly, blockade of CX3CR1 induced a variable inhibition of this migration depending on the type of leukocytes. Complex mechanisms of chemokine-mediated cell interaction are involved in immune cell migration to the inflamed tissue, and CX3CL1 appears to play an essential role in the trafficking of monocytes/macrophages and NKs. Other chemokines such as CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, and CXCL12 may be involved in conjunctival inflammatory cell infiltration depending on the expression pattern of chemokine receptors in human leukocytes[52].

Recently, transgenic mice have been generated to follow the corneal immune cell turnover in relation with CX3CL1/CX3CR1[39-41]. Given our results from migration assays, we investigated *in vivo* the inflammatory cell infiltration into the conjunctiva of CX3CR1-deficient mice exposed to BAC. We did not find any difference in the density of CX3CR1+ resident DCs between CX3CR1^{+/+} and CX3CR1-deficient mice. Consistent with this result, a previous study in the mouse retina, iris, and ciliary body reported that DC homing does not depend on CX3CR1[53]. However, another elegant study by Chinery *et al.* found CX3CR1-dependent DC turnover in the cornea[38]. This difference may stem from differences in structure between the cornea and the other ocular tissues. Similarly, CD45+ cell infiltration was not different in untreated conjunctivas of CX3CR1-deficient mice compared to CX3CR1^{+/+}. As previously published, BAC is known to induce infiltration of inflammatory cells such as granulocytes, lymphocytes, and macrophages into the outer layer of the conjunctiva[21-24]. Our results confirmed this infiltration in the conjunctiva of eyes exposed to BAC. However, BAC-induced F4/80+ macrophage infiltration was deeply reduced in the conjunctiva of CX3CR1-deficient mice compared to controls, whereas neither granulocyte

nor lymphocyte infiltration was affected. Consistent with these results, a recent study on an animal model of corneal alkali burn revealed that CX3CR1-deficient mice presented a decrease in macrophage infiltration, but not in neutrophil and lymphocyte infiltration, compared to wild-types[54]. More precisely, authors highlighted that monocytes or monocyte-derived macrophages consist in two subsets, namely CD16^{high}-CX3CR1^{high}-CCR2^{low} and CD16^{low}-CX3CR1^{low}-CCR2^{high} subpopulations[52,55,56] that migrate in different ways. Consistent with these findings, we reported that some macrophages were still infiltrating the conjunctiva in BAC-exposed CX3CR1-deficient mice, suggesting that other chemokine/receptor(s) such as CCL2/CCR2 could be involved in such a BAC-induced migration.

Clinical surveys as well as experimental studies have previously reported that preserved eye drops caused secondary ocular surface disease related to the preservative toxicity adding to ocular surface inflammation and damage. However, preservatives including BAC are still commonly used in several ophthalmic medications against allergy, dry eye disease, and glaucoma. We report that BAC induces an overexpression of CX3CL1 in CECs, further demonstrating that preservative can directly enhance inflammatory cell infiltration in the conjunctiva by modulating CX3CL1-mediated cell interactions. We demonstrate in an original way that epithelial cells play a role in conjunctival inflammation and immune cell trafficking through a chemokine system.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by INSERM grant for AD, DG, FB, WR, and CB, and by UPMC grant for JF and IC. We thank Christophe Combadière, Michel Pâques, and Manuel Simonutti (INSERM U968, Paris, FR) for providing us transgenic mice. We also thank Christophe Combadière (INSERM U543, Paris, FR) for his helpful advices.

REFERENCES

- 1 Baudouin C, Labbé A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F. Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res* 2010;29:312-34.
- 2 Baudouin C. Detrimental effect of preservatives in eyedrops: implication for the treatment of glaucoma. *Acta Ophthalmol* 2008;86:716-26.
- 3 Beden C, Helleboid L, Marmouz F, Liard F. A comparative study of the ocular tolerance after administration of anti-allergic eye drops with or without a preservative. *Thérapie* 2004; 59:259-264.
- 4 Chawla A, McGalliard JN, Batterbury M. Use of eye drops in glaucoma: how can we help to reduce non-compliance? *Acta Ophthalmol Scand* 2007;85: 464.
- 5 Costagliola C, Del Prete A, Incorvaia C, Fusco R, Parmeggiani F, Di Giovanni A. Ocular surface changes induced by topical application of latanoprost and timolol: a short-term study in glaucomatous patients with and without allergic conjunctivitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001;239:809-14.
- 6 Pisella P-J, Pouliquen P, Baudouin C. Prevalence of ocular symptoms and signs with preserved and preservative free glaucoma medication. *Br J Ophthalmol* 2002;86:418-23.
- 7 Bielory L. Allergic and immunologic disorders of the eye. Part II: ocular allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:1019-32.
- 8 Baudouin C. Allergic reaction to topical eyedrops. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5:459-63.
- 9 Hong J, Bielory L. Allergy to Ophthalmic preservatives. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009;9:447-53.
- 10 Jaenen N, Baudouin C, Pouliquen P, Manni G, Figueiredo A, Zeyen T. Ocular symptoms and signs with preserved and preservative-free glaucoma medications. *Eur J Ophthalmol* 2007;17:341-9.
- 11 Denoyer A, Ossant F, Arbeille B, Fetissof F, Patat F, Pourcelot L, Pisella P-J. Very-high-frequency ultrasound corneal imaging as a new tool for early diagnosis of ocular surface toxicity in rabbits treated with a preserved glaucoma drug. *Ophthalmic Res* 2008;40:298-308.
- 12 Brasnu E, Brignole-Baudouin F, Riancho L, Warnet J-M, Baudouin C. Comparative study on the cytotoxic effect of benzalkonium chloride on the Wong-Kilbourne derivative of Chang conjunctival and IOBA-NHC cell lines. *Mol Vis* 2008;14:394-402.
- 13 De Saint Jean M, Brignole F, Bringuier AF, Bauchet A, Feldmann G, Baudouin C. Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:619-30.
- 14 Debbasch C, Brignole F, Pisella PJ, Warnet JM, Rat P, Baudouin C. Quaternary ammoniums and other preservatives' contribution in oxidative stress and apoptosis on Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:642-52.

- 15 Dogan AS, Orhan M, Söylemezoglu F, Irkeç M, Bozkurt B. Effects of topical antiglaucoma drugs on apoptosis rates of conjunctival epithelial cells in glaucoma patients. *Clin Exp Ophthalmol* 2004;32:62-6.
- 16 Epstein SP, Chen D, Asbell PA. Evaluation of biomarkers of inflammation in response to benzalkonium chloride on corneal and conjunctival epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 2009;25:415-24.
- 17 Baudouin C, Pisella P-J, Fillacier K, Goldschild M, Becquet F, De Saint Jean M, Béchettoille A. Ocular surface inflammatory changes induced by topical antiglaucoma drugs. *Ophthalmology* 1999 ;106 :556-63.
- 18 Baudouin C, Hamard P, Liang H, Creuzot-Garcher C, Bensoussan L, Brignole F. Conjunctival epithelial cell expression of interleukins and inflammatory markers in glaucoma patients treated over the long term. *Ophthalmology* 2004;111:2186-92.
- 19 Brignole F, De Saint-Jean M, Goldschild M, Becquet F, Goguel A, Baudouin C. Expression of Fas-Fas ligand antigens and apoptotic marker APO2.7 by the human conjunctival epithelium: positive correlation with class II HLA DR expression in inflammatory ocular surface disorders. *Exp Eye Res* 1998;67:687-97.
- 20 Pisella P-J, Debbash C, Hamard P, Creuzot-Garcher C, Rat P, Brignole F, Baudouin C. Conjunctival proinflammatory and proapoptotic effects of latanoprost and preserved and unpreserved timolol : an ex vivo and in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1360-8.
- 21 Becquet F, Goldschild M, Moldovan MS, Ettaiche M, Gastaud P, Baudouin C. Histopathological effects of topical ophthalmic preservatives on rat corneconjunctival surface. *Curr Eye Res* 1998;17:419-25.
- 22 Kahook MY, Noecker RJ. Comparison of corneal and conjunctival changes after dosing of travoprost preserved with sofZia, latanoprost with 0.02% benzalkonium chloride, and preservative-free artificial tears. *Cornea* 2008;27:339-43.
- 23 Noecker RJ, Herrygers LA, Anwaruddin R. Corneal and conjunctival changes caused by commonly used glaucoma medications. *Cornea* 2004;23:490-6.
- 24 Sherwood MB, Grierson I, Millar L, Hitchings RA. Long-term morphologic effects of antiglaucoma drugs on the conjunctiva and Tenon's capsule in glaucomatous patients. *Ophthalmology* 1989;96:327-35.
- 25 Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Ross D, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997;385:640-4.
- 26 Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 1997;91:521-30.
- 27 Chapman GA, Moores KE, Gohil J, Berkhout TA, Patel L, Green P, et al. The role of fractalkine in the recruitment of monocytes to the endothelium. *Eur J Pharmacol* 2000;392:189-95.

- 28 Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, et al. Tumor necrosis factor- α converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem* 2001;276:37993–38001.
- 29 Goda S, Imai T, Yoshie O, Yoneda O, Inoue H, Nagano Y, et al. CX3C-chemokine fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and –independent mechanisms. *J Immunol* 2000;164:4313-20.
- 30 Combadiere C, Potteaux S, Gao JL, Esposito B, Casanova S, Lee EJ, et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation* 2003;107:1009-16.
- 31 Imaizumi T, Yoshida H, Satoh K. Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* 2004;11:15-21.
- 32 Lucas AD, Chadwick N, Warren BF, Jewell DP, Gordon S, Powrie F, Greaves DR. The transmembrane form of the CX3CL1 chemokine fractalkine is expressed predominantly by epithelial cells in vivo. *Am J Pathol* 2001;158:855-66.
- 33 Muehlhoefer A, Saubermann LJ, Gu X, Luedtke-Heckenkamp K, Xavier R, Blumberg RS, et al. Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa. *J Immunol* 2000;164:3368-76.
- 34 Raychaudhuri SP, Jiang WY, Farber EM. Cellular localization of fractalkine at sites of inflammation: antigen-presenting cells in psoriasis express high levels of fractalkine. *Br J Dermatol* 2001;144:1105-13.
- 35 Echigo T, Hasegawa M, Shimada Y, Takehara K, Sato S. Expression of fractalkine and its receptor, CX3CR1, in atopic dermatitis: possible contribution to skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:940-8.
- 36 El-shazly A, Berger P, Girodet PO, Ousova O, Fayon M, Vernejoux JM, et al. Fractalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma. *J Immunol* 2006;176:1860-8.
- 37 Rimaniol A-C, Till SJ, Garcia G, Capel F, Godot V, Balabanian K, et al. The CX3C chemokine fractalkine in allergic asthma and rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:1139-46.
- 38 Chinnery HR, Humphries T, Clare A, Dixon AE, Howes K, Moran CB, et al. Turnover of bone marrow-derived cells in the irradiated mouse cornea. *Immunology* 2008;125:541-8.
- 39 Chinnery HR, Ruitenber MJ, Plant GW, Pearlman E, Jung S, McMenamin PG. The chemokine receptor CX3CR1 mediates homing of MHC class II-positive cells to the normal mouse corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:1568-74.
- 40 Jung Steffen, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR. Analysis of fractalkine receptor CX3CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 2000;20:4106-14.
- 41 Kezic J, McMenamin PG. Differential turnover rates of monocyte-derived cells in varied ocular tissue microenvironments. *J Leukol Biol* 2008;84:721-9.

- 42 Combadière C, Feumi C, Raoul W, Keller N, Rodéro M, Pézard A, et al. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J Clin Invest* 2007;117:2920-8.
- 43 Klaassen-Broekema N, Mackor AJ, van Bijsterveld OP. The diagnostic power of the tests for tear gland related keratoconjunctivitis sicca. *Neth J Med* 1992;40:113-6.
- 44 Baudouin C, Brignole F, Becquet F, Pisella PJ, Goguel A. Flow cytometry in impression cytology specimens: a new method for evaluation of conjunctival inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:1458-64.
- 45 Baudouin C, Liang H, Bremond-Gignac D, Hamard P, Hreic R, Creuzot-Garcher C, et al. CCR4 and CCR5 expression in conjunctival specimens as differential markers of Th1/Th2 in ocular surface disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:614-9.
- 46 Diebold Y, Calonge M, Enriquez de Salamanca A, Callejo S, Corrales RM, Saez V, et al. Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4263-74.
- 47 Ichijima H, Petroll WM, Jester JV, Cavanagh HD. Confocal microscopic studies of living rabbits cornea treated with benzalkonium chloride. *Cornea* 1992;11:221-5.
- 48 Liang H, Brignole-Baudouin F, Rabinovich-Guilatt L, Mao Z, Riancho L, Faure MO, et al. Reduction of quaternary emulsion ammonium-induced ocular surface toxicity by emulsions: an in vivo study in rabbits. *Mol Vis* 2008;14:204-16.
- 49 Ruth JH, Volin MV, Haines GK 3rd, Woodruff DC, Katschke KJ Jr, Woods JM, et al. Fractalkine, a novel chemokine in rheumatoid arthritis and in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44:1568-81.
- 50 Wildenberg ME, van Helden-Meeuwsen CG, Drexhage HA, Versnel MA: Altered fractalkine cleavage potentially promotes local inflammation in NOD salivary gland. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R69.
- 51 Baudouin C, Liang H, Hamard P, Riancho L, Creuzot-Garcher C, Warnet JM, Brignole-Baudouin F. The ocular surface of glaucoma patients treated over the long term expresses inflammatory markers related to both T-helper 1 and T-helper 2 pathways. *Ophthalmology*. 2008;115:109-15.
- 52 Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinkas FW, Gabuzda D. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med* 2003;197:1701-7.
- 53 Kezic J, Xu H, Chinnery HR, Murphy CC, McMenemy PG. Retinal microglia and uveal tract dendritic cells and macrophages are not CX3CR1 dependent in their recruitment and distribution in the young mouse eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:1599-608.
- 54 Lu P, Li L, Kuno K, Wu Y, Baba T, Li Y-y, et al. Protective roles of the fractalkine/CX3CL1-CX3CR1 interactions in alkali-induced corneal neovascularization through enhanced antiangiogenic factor expression. *J Immunol* 2008;180:4283-91.

55 Lu P, Li L, Liu G, van Rooijen N, Mukaida N, Zhang X. Opposite roles of CCR2 and CX3CR1 macrophages in alkali-induced corneal neovascularization. *Cornea* 2009;28:562-9.

56 Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003;19:71-82.

TABLE

Table 1. Correlations between patient clinical features and CX3CL1 expression assessed by conjunctival impression cytology.

	Patient features mean ± SEM	Correlation with CX3CL1 level
Duration of treatment [year]	9 ± 4.6	R ² =0.015, p>0.05
Number of medications	2.25 ± 0.6	R ² =0.07, p>0.05
Conjunctival hyperhaemia [0 – 5]	1.75 ± 0.65	R ² =0.247, p>0.05
Conjunctival epithelial staining [0 – 9]	1.7 ± 1.36	R²=0.723, p=0.012*
Tear break-up time [sec]	7.5 ± 2.5	R ² =0.248, p>0.05

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Conjunctival cell expression of CX3CL1, CX3CR1 and HLA-DR in BAC-exposed patients (mean \pm SEM). n=20 in each group. **: $P<0.01$. See representative fluorescence histograms of CX3CL1 and HLA-DR expression in a patient exposed to BAC (shaded area) compared to an unexposed control (solid line).

Figure 2. BAC-inducible expression of CX3CL1 in a human conjunctival epithelial cell (CEC) line. **A**, representative immunohistofluorescence of BAC-stimulated CECs compared to control (insert), magnification $\times 200$. **B**, comparative levels of mRNAs (relative folds change, mean \pm SEM). c, d, e: dose- and time-dependant BAC-inducible expression of CX3CL1 (mean \pm SEM). **: $P<0.01$.

Figure 3. CX3CL1-mediated chemoattractant effect of conjunctival epithelial cells (CECs) on human leukocytes (mean \pm SEM). **A**, non-adherent leukocyte migration assay. **B**, macrophage migration assay. *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ compared to unstimulated CECs. §§: $P<0.01$ compared to BAC-stimulated CECs and untreated leukocytes.

Figure 4. Inflammatory cell infiltration in the conjunctiva of CX3CR1-deficient mice exposed to BAC compared to CX3CR1^{+/+} (mean \pm SEM). n=10 in each group. **: $P<0.01$ compared to CX3CR1^{+/+}. Note the same y-axis scale.

Figure 1

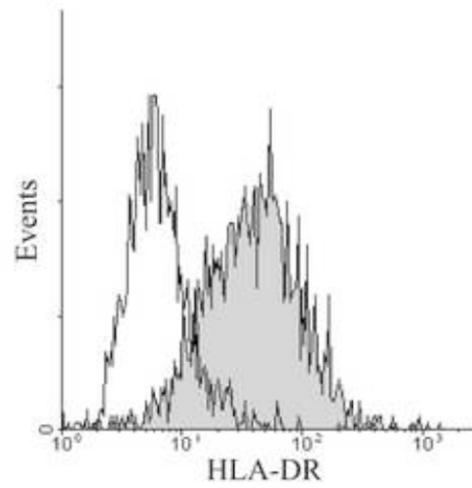
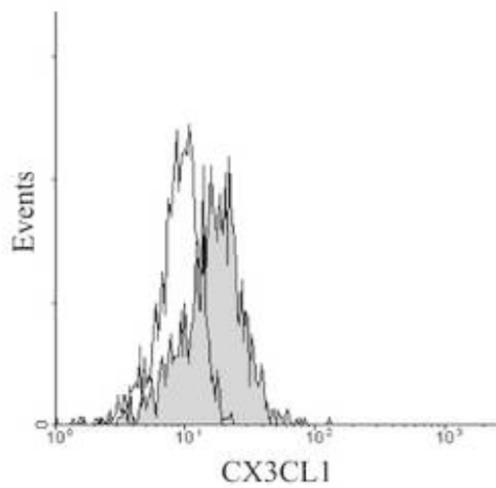
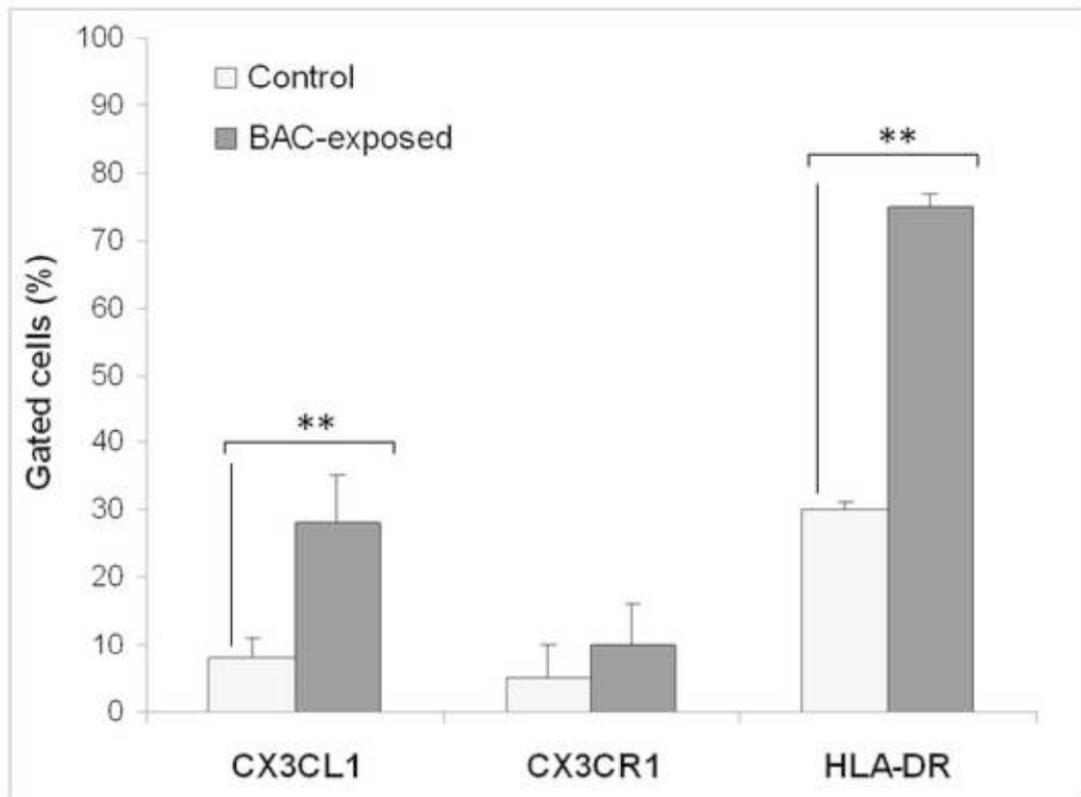


Figure 2

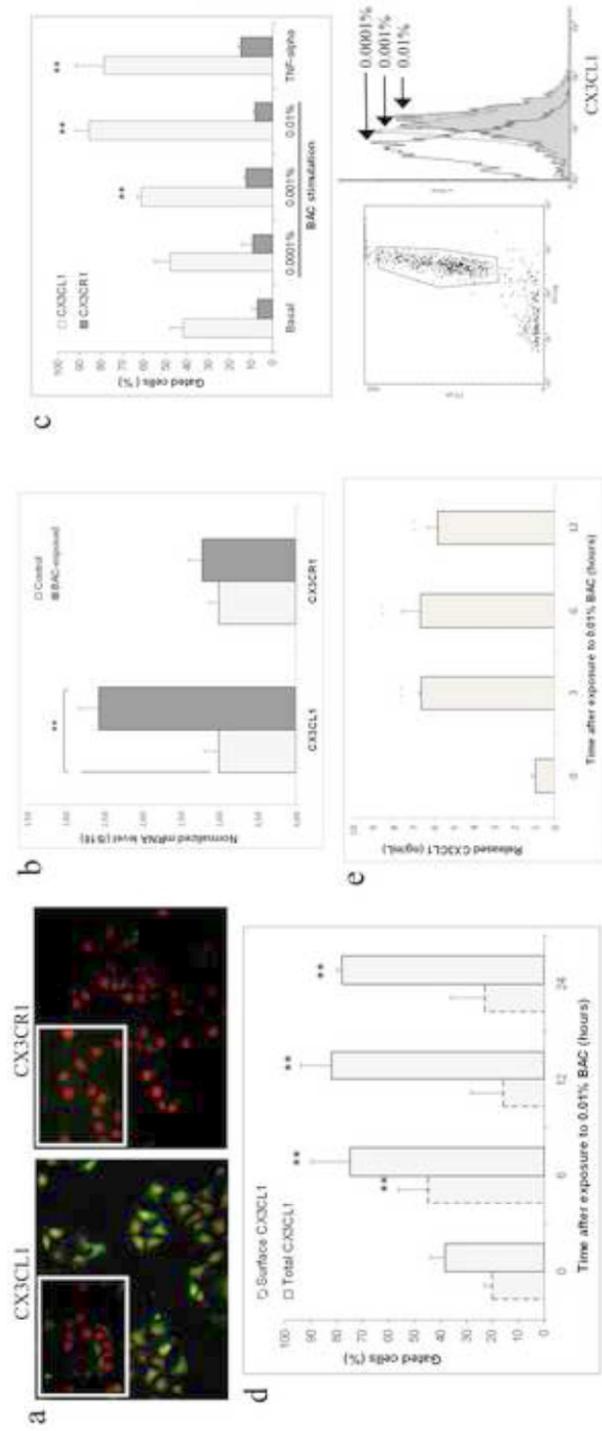


Figure 3

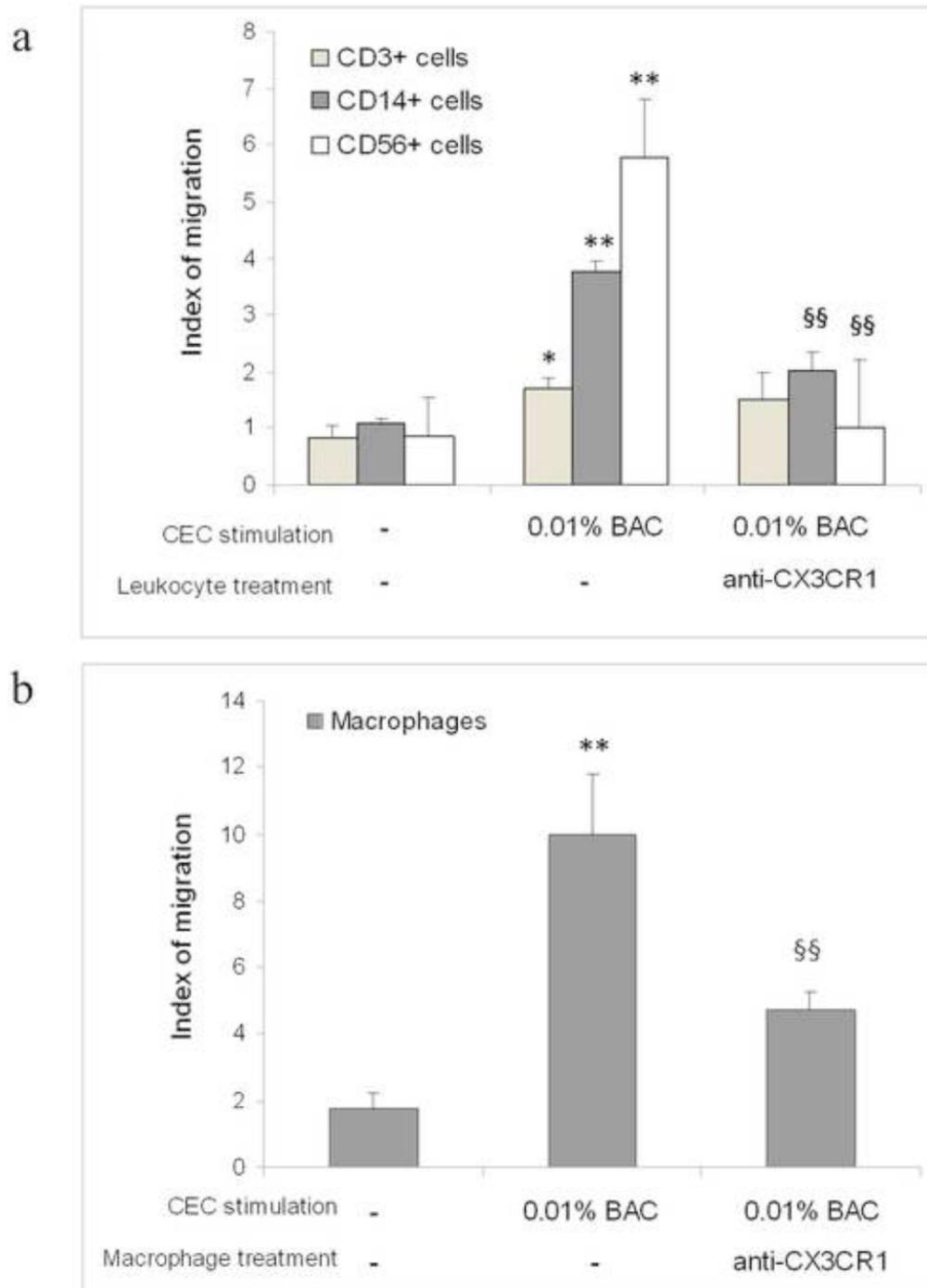
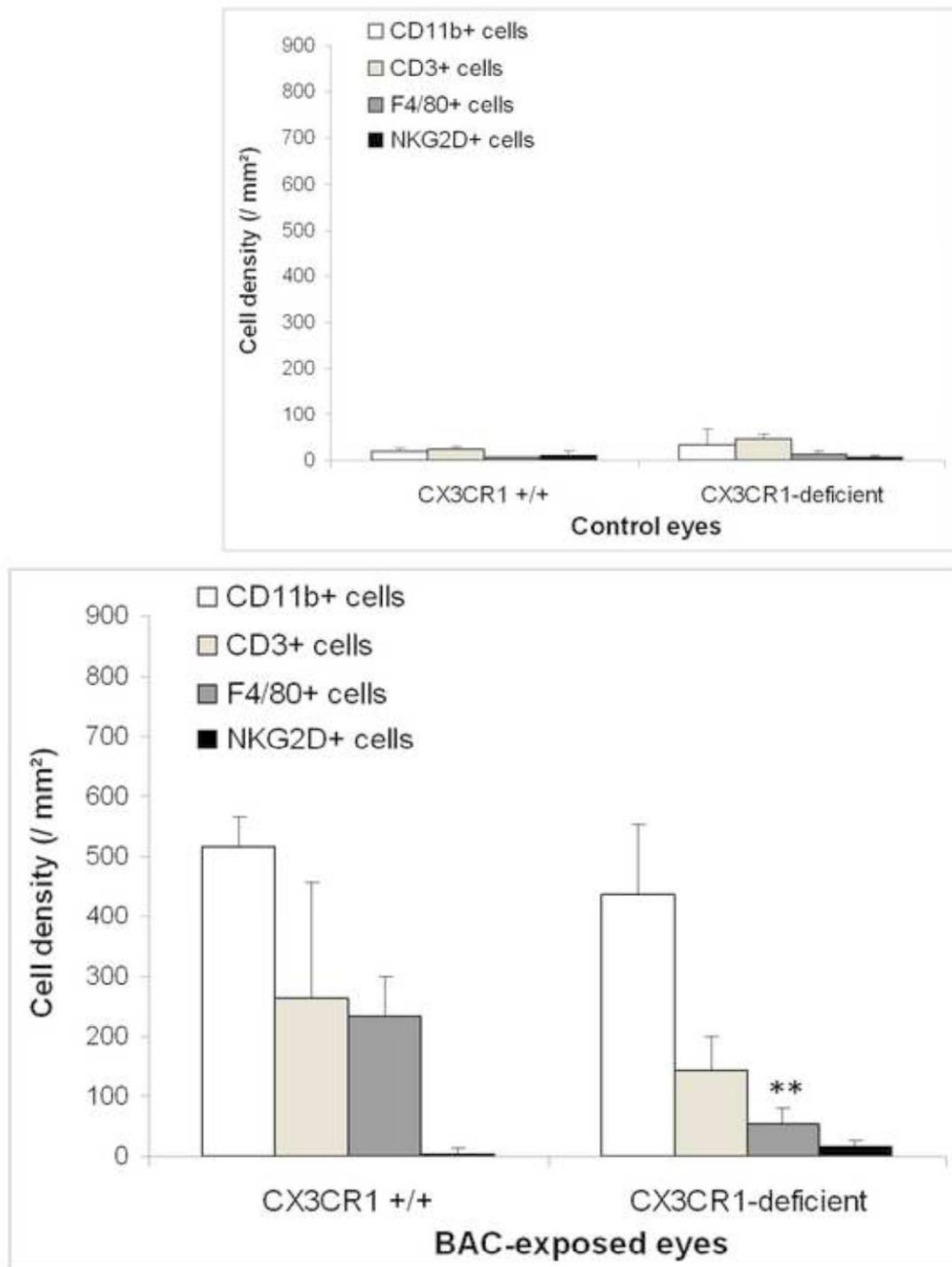


Figure 4



3 COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

- Cleavage of the Chemokine CXCL12 is Involved in the Trabecular Cell Apoptosis *via* CXCR3. A Denoyer, D Godefroy, I Celerier, J Frugier, F Baudouin, W Rostene, C Baudouin. Congrès annuel de l'Association for Research in Vision and Ophthalmology, Fort-Lauderdale, USA, Mai 2011.
- La chimiokine CX3CL1/fractalkine est impliquée dans l'inflammation de la surface oculaire. A Denoyer, A Grise, D Godefroy, I Célérier, F Baudouin, W Rostène, C Baudouin. Congrès annuel de la Société Française d'Ophtalmologie, Paris, Mai 2011.
- Are chemokines involved in the regulation of the trabecular microenvironment ? A Denoyer, D Godefroy, J Frugier, F Baudouin, W Rostène, C Baudouin. Congrès annuel de l'European Glaucoma Society, Madrid, Espagne, Septembre 2010.
- CXCL12 is involved in the ocular trabecular cell death. A Denoyer, D Godefroy, I Célérier, W Rostène, C Baudouin. Gordon's Research Conference / Chemokines, Pise, Italie, Juin 2010.
- CX3CL1/fractalkine is involved in the ocular surface inflammation induced by benzalkonium chloride. A Denoyer, D Godefroy, J Frugier, F Baudouin, W Rostène, C Baudouin. Congrès annuel de l'ARVO, Fort-Lauderdale, USA, Mai 2010.
- CX3CL1/fractalkine in the trabecular meshwork. A Denoyer, A Grise, W Rostène, F Baudouin, C Baudouin. World Glaucoma Congress, Boston, USA, Octobre 2009.
- Role of chemokines in the regulation of the trabecular cell micro environment. A Denoyer, W Rostène, C Baudouin. European Glaucoma Society advanced meeting, Lyon, Août 2009.
- Chimiokines et physiopathologie trabéculaire :de nouvelles pistes thérapeutiques contre le glaucome ? A Denoyer, D Godefroy, W Rostène, C Baudouin. Congrès annuel de la Société Française d'Ophtalmologie, Paris, Mai 2009.
- Role of CX3CL1(Fractalkine) and CX3CR1 in the inflammatory cell trafficking of the conjunctiva. A Denoyer, D Godefroy, W Rostène, C Baudouin. Congrès annuel de l'ARVO, Fort-Lauderdale, USA, Mai 2009.

REFERENCES

A

- Abu el-Asrar, A. M., K. Geboes, et al. (1996). Immunopathogenesis of vernal keratoconjunctivitis. *Bull Soc Belge Ophtalmol* 261:15-24.
- Acott, T.S., Kelley, M.J. (2008). Extracellular matrix in the trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 86:543-561.
- Alexander, J.P., Acott, T.S. (2001). Involvement of protein kinase C in TNF α regulation of trabecular matrix metalloproteinases and TIMPs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2831-2838.
- Alexander, C. L., S. J. Miller, et al. (2002). Prostaglandin analog treatment of glaucoma and ocular hypertension. *Ann Pharmacother* 36:504-511.
- Allingham, R. R., A. W. de Kater, et al. (1992). The relationship between pore density and outflow facility in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33:1661-1669.
- Alvarado, J., Murphy, C., Juster, R. (1984). Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and non-glaucomatous normals. *Ophthalmology* 91:564-579.
- Amara, A., Lorthioir, O., et al. (1999). Stromal cell-derived factor-1 α associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine. *J Biol Chem* 274:23916-23925.
- Ancuta, P., Rao, R., et al. (2003). Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med* 197:1701-1707.
- Arici, M. K., D. S. Arici, et al. (2000). Adverse effects of topical antiglaucoma drugs on the ocular surface. *Clin Experiment Ophthalmol* 28:113-117.
- Ariturk, N., I. Oge, et al. (1996). The effects of antiglaucomatous agents on conjunctiva used for various durations. *Int Ophthalmol* 20:57-62.
- Asbell, P. A. and N. Potapova (2005). Effects of topical antiglaucoma medications on the ocular surface. *Ocul Surf* 3:27-40.

B

- Babizhayev, M.A., Bunin, A. (1989). Lipid peroxidation in open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 67:371-377.
- Balabanian, K., Lagane, B., et al. (2005). The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 280:35760-35766.
- Baleriola, J., García-Feijoo, J., et al. (2008) Apoptosis in the trabecular meshwork of glaucomatous patients *Mol Vis* 14:1513-1516.
- Barbieri, F., Bajetto, A., et al. (2006). CXC receptor and chemokine expression in human meningioma: SDF1/CXCR4 signaling activates ERK1/2 and stimulates meningioma cell proliferation. *Ann N Y Acad Sci* 1090:332-343.
- Baudouin, C., Haouat, N., et al. (1992). Immunopathological findings in conjunctival cells using immunofluorescence staining of impression cytology specimens. *Br J Ophthalmol* 76:545-549.

- Baudouin, C., Garcher, C., et al. (1994). Expression of inflammatory membrane markers by conjunctival cells in chronically treated patients with glaucoma. *Ophthalmology* 101:454-560.
- Baudouin, C., Brignole, F., et al. (1997). Flow cytometry in impression cytology specimens. A new method for evaluation of conjunctival inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:1458-1464.
- Baudouin, C., Brignole, F., et al. (1997). Immunophenotyping of human dendriform cells from the conjunctival epithelium. *Curr Eye Res* 16:475-481.
- Baudouin, C., Pisella, P.-J., et al. (1999). Ocular surface inflammatory changes induced by topical antiglaucoma drugs: human and animal studies. *Ophthalmology* 106:556-563.
- Baudouin, C. (2001). The pathology of dry eye. *Surv Ophthalmol* 45:S211-220.
- Baudouin, C., Nordmann, J.-P., et al. (2002). Efficacy of indomethacin 0.1% and fluorometholone 0.1% on conjunctival inflammation following chronic application of antiglaucomatous drugs. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 240:929-935.
- Baudouin, C., Hamard, P., et al. (2004). Conjunctival epithelial cell expression of interleukins and inflammatory markers in glaucoma patients treated over the long term. *Ophthalmology* 111:2186-2192.
- Baudouin, C., Liang, H., et al. (2005). CCR 4 and CCR 5 expression in conjunctival specimens as differential markers of T(H)1/ T(H)2 in ocular surface disorders. *J Allergy Clin Immunol* 116:614-619.
- Baudouin, C. (2008). Detrimental effect of preservatives in eyedrops: implications for the treatment of glaucoma. *Acta Ophthalmol* 86:716-726.
- Baudouin, C., Labbe, A., et al. (2008). Imaging the ocular surface with confocal microscopy: histology without samples. *J Fr Ophtalmol* 31:308-316.
- Baudouin, C., Liang, H., et al. (2008). The ocular surface of glaucoma patients treated over the long term expresses inflammatory markers related to both T-helper 1 and T-helper 2 pathways. *Ophthalmology* 115:109-115.
- Baudouin, C., Labbé, A., et al. (2010). Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye* 29:312-334.
- Bazan, J.F., Bacon, K.B., et al. (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385:640-644.
- Bechetoille, A. (1997). *Les glaucomes, Japperenard. Volume 1.*
- Becquet, F., M. Goldschild, et al. (1998). Histopathological effects of topical ophthalmic preservatives on rat corneoconjunctival surface. *Curr Eye Res* 17:419-425.
- Beden, C., Helleboid, L., et al. (2004). A comparative study of the ocular tolerance after administration of anti-allergic eye drops with or without a preservative. *Therapie* 59:259-264.
- Bensoussan, L., C. Blondin, et al. (2003). Flow cytometric analysis of HLA-DR, IL-6 and IL-8 expression by conjunctival epithelial cells from patients with prolonged topical antiglaucoma treatments. *J Fr Ophtalmol* 26 :782-789.

- Bertolini, F., Dell'Agnola, C., et al. (2002). CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res* 62:3106-3112.
- Bhutto, I.A., McLeod, D.S., et al. (2006). Localisation of SDF-1 and its receptor CXCR4 in retina and choroid of aged human eyes and in eyes with age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 90:906-910.
- Bielory, L. (2000). Allergic and immunologic disorders of the eye. Part II:ocular allergy. *J Allergy Clin Immunol* 106:1019-1032.
- Bill, A., Phillips, C.I. (1971). Uveoscleral drainage of aqueous humour in human eyes. *Exp Eye Res* 12:275-281.
- Blaise, P. and S. Guillaume (2005). Circadian variations in intraocular pressure and their clinical implications. *J Fr Ophtalmol* 28:317-325.
- Booth, V., Keizer, D.W., et al. (2002). The CXCR3 binding chemokine IP-10/CXCL10:structure and receptor interactions. *Biochemistry* 41:10418-10425.
- Bora, N. S., C. L. Gobleman, et al. (1993). Differential expression of the complement regulatory proteins in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:3579-3584.
- Borenfreund, E., Puerner, J.A. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 24:119-124.
- Bouchard, C. S., J. B. Lasky, et al. (1996). Ocular surface upregulation of intercellular adhesive molecule-1 (ICAM-1) by local interferon-gamma (IFN-gamma) in the rat. *Curr Eye Res* 15:203-208.
- Bourcier, T., Berbar, T., et al. (2003). Characterization and functionality of CXCR4 chemokine receptor and SDF-1 in human corneal fibroblasts. *Mol Vis* 9:96-102.
- Brandt, J. D., J. R. Wittpenn, et al. (1991). Conjunctival impression cytology in patients with glaucoma using long-term topical medication. *Am J Ophthalmol* 112:297-301.
- Brasnu, E., Brignole-Baudouin, F., et al. (2008). Comparative study on the cytotoxic effect of benzalkonium chloride on the Wong-Kilbourne derivative of Chang conjunctival and IOBA-NHC cell lines. *Mol Vis* 14:394-402.
- Brignole, F., De Saint-Jean, M., et al. (1998). Expression of Fas-Fas ligand antigens and apoptotic marker APO2.7 by the human conjunctival epithelium. Positive correlation with class II HLA DR expression in inflammatory ocular surface disorders. *Exp Eye Res* 67:687-697.
- Brignole, F., Pisella, P.-J., et al. (2000). Flow cytometric analysis of inflammatory markers in conjunctival epithelial cells of patients with dry eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:1356-1363.
- Brignole-Baudouin, F., Ott, A.C., et al. (2004). Flow cytometry in conjunctival impression cytology:a new tool for exploring ocular surface pathologies. *Exp Eye Res* 78:473-481.
- Broadway, D. C., I. Grierson, et al. (1994). Adverse effects of topical antiglaucoma medication. I. The conjunctival cell profile. *Arch Ophthalmol* 112:1437-1445.

Bron, A. J., J. M. Tiffany, et al. (2004). Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res* 78:347-360.

Brubaker, R. F. (1991). Flow of aqueous humor in humans The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:3145-3166.

Brubaker, R.F. (2004). Goldmann's equation and clinical measures of aqueous dynamics. *Exp Eye Res* 78:633-637

Burns, J.M., Summers, B.C., et al. (2006). A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* 203:2201-2213.

Burstein, N. L. (1980). Corneal cytotoxicity of topically applied drugs, vehicles and preservatives. *Surv Ophthalmol* 25 :15-30.

Busillo, J.M., Benovic, J.L. (2007). Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta* 1768:952-963.

C

Caballero, M., Liton, P.B., et al. (2003). Proteasome inhibition by chronic oxidative stress in human trabecular meshwork cells. *Biochem Biophys Res Commun* 308:346-352.

Callewaere, C., Banisadr, G., et al. (2007). Chemokines and chemokine receptors in the brain:implication in neuroendocrine regulation. *J Mol Endocrinol* 38:355-363.

Cashen, A., Lopez, S., et al. A phase II study of plerixafor (AMD3100) plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization in patients with Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 14:1253-1261.

Cedrone, C., Mancino, R., et al. (2008). Epidemiology of primary glaucoma:prevalence, incidence, and blinding effects. *Prog Brain Res* 173:3-14.

Chapman, G.A., Moores, K.E., et al. (2000) The role of fractalkine in the recruitment of monocytes to the endothelium. *Eur J Pharmacol* 392:189-195.

Chawla, A., J. N. McGalliard, et al. (2007). Use of eyedrops in glaucoma:how can we help to reduce non-compliance? *Acta Ophthalmol Scand* 85:464.

Chinnery, H.R., Ruitenber, M.J., et al. (2007). The chemokine receptor CX3CR1 mediates homing of MHC class II-positive cells to the normal mouse corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:1568-1574.

Chinnery, H.R., Humphries, T., et al. (2008). Turnover of bone marrow-derived cells in the irradiated mouse cornea. *Immunology* 125:541-548.

Combadiere, C., Potteaux, S., et al. (2003). Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation* 107:1009-1016.

Combadière, C., Feumi, C., et al. (2007). CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J Clin Invest* 117:2920-2928.

Costa, V. P., A. Harris, et al. (2003). The effects of antiglaucoma and systemic medications on ocular blood flow. *Prog Retin Eye Res* 22:769-805.

Costagliola, C., Del Prete, A., et al. (2001). Ocular surface changes induced by topical application of latanoprost and timolol: a short-term study in glaucomatous patients with and without allergic conjunctivitis. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 239:809-814.

Crane, I.J., Wallace, C.A., et al. (2000). CXCR4 receptor expression on human retinal pigment epithelial cells from the blood-retina barrier leads to chemokine secretion and migration in response to stromal cell-derived factor 1 alpha. *J Immunol* 165:4372-4378.

Crump, M.P., Gong, J.H., et al. (1997). Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1 dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J* 16:6996-7007.

Curnow, S.J., Wloka, K., et al. (2004). Topical glucocorticoid therapy directly induces up-regulation of functional CXCR4 on primed T lymphocytes in the aqueous humor of patients with uveitis. *J Immunol* 172:7154-7161.

Cvenkel, B. and A. Ihan (2002). Ocular surface changes induced by topical antiglaucoma monotherapy. *Ophthalmologica* 216:175-179.

D

Danias, J., Shen, F., et al. (2006). Characterization of retinal damage in the episcleral vein cauterization rat glaucoma model. *Exp Eye Res* 82:219-228.

De Kater, A.W., Melamed, S., Epstein, D.L. (1989). Patterns of aqueous humor outflow in glaucomatous and nonglaucomatous human eyes. A tracer study using cationized ferritin. *Arch Ophthalmol* 107:572-576.

De La Luz Sierra, M., Yang, F., et al. Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. *Blood* 103:2452-2459.

De La Paz, M.A., Epstein, D.L. (1996). Effect of age on superoxide dismutase activity of human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sc* 37:1849-1853.

De Saint Jean, M., F. Brignole, et al. (1999). Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:619-630.

Dealwis, C., Fernandez, E.J., et al. (1998). Crystal structure of chemically synthesized N33A stromal cell-derived factor 1alpha, a potent ligand for the HIV-1 fusin coreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6941-6946.

Debbasch, C., P. J. Pisella, et al. (2000). Evaluation of free radical production by conjunctival impression cytology of patients treated with long-term antiglaucoma drugs or of contact lens wearers. *J Fr Ophtalmol* 23:239-244.

Delgado, M.B., Clark-Lewis, I., et al. (2001). Rapid inactivation of stromal cell-derived factor-1 by cathepsin G associated with lymphocytes. *Eur J Immunol* 31:699-707.

Denis, P., Lafuma, A., Berdeaux, G. (2008). Costs and persistence of alpha-2 adrenergic agonists versus carbonic anhydrase inhibitors, both associated with prostaglandin analogues, for glaucoma as recorded by The United Kingdom General Practitioner Research Database. *Clin Ophthalmol* 2:321-329.

- Denoyer, A., F. Ossant, et al. (2006). In vivo assessment of corneal epithelial toxicity of timolol with benzalkonium chloride using very-high-frequency ultrasound imaging. *J Fr Ophtalmol* 29:11-18.
- Denoyer, A., F. Ossant, et al. (2008). Very-high-frequency ultrasound corneal imaging as a new tool for early diagnosis of ocular surface toxicity in rabbits treated with a preserved glaucoma drug. *Ophthalmic Res* 40:298-308.
- Diebold, Y., Calonge, M., et al. (2003). Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:4263-4274.
- Dieu-Nosjean, M.C., Vicari, A., et al. (1999). Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J Leukoc Biol* 66:252-262.
- Dogan, A. S., M. Orhan, et al. (2004). Effects of topical antiglaucoma drugs on apoptosis rates of conjunctival epithelial cells in glaucoma patients. *Clin Experiment Ophthalmol* 32:62-66.
- Donzella, G.A., Schols, D., et al. (1998). AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med* 4:72-77.
- Doranz, B.J., Berson, J.F., et al. (1997). Chemokine receptors as fusion cofactors for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Immunol Res* 16:15-28.
- E**
- Ebert, L.M., Schaerli, P., Moser, B. (2005). Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol Immunol* 42:799-809.
- Echigo, T., Hasegawa, M., et al. (2004). Expression of fractalkine and its receptor, CX3CR1, in atopic dermatitis: possible contribution to skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 113:940-948.
- El-shazly, A., Berger, P., et al. (2006). Fractalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma. *J Immunol* 176:1860-1868.
- Enríquez-de-Salamanca, A., Castellanos, E., et al. (2010). Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol Vis* 16:862-873.
- Epstein, S.P., Chen, D., Asbell, P.A. (2009). Evaluation of biomarkers of inflammation in response to benzalkonium chloride on corneal and conjunctival epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 25:415-424.
- Estes, J.D., Thacker, T.C., et al. (2004). Follicular dendritic cell regulation of CXCR4-mediated germinal center CD4 T cell migration. *J Immunol* 173:6169-6178.
- Ethier, C. R., R. D. Kamm, et al. (1986). Calculations of flow resistance in the juxtacanalicular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27:1741-1750.
- European-Glaucoma-Society (2003). Terminology and guidelines for glaucoma. Savona, Italy.

F

Fan, B.J., Wiggs, J.L. (2010). Glaucoma: genes, phenotypes, and new directions for therapy. *J Clin Invest* 120:3064-3072.

Fernández-Durango, R., Fernández-Martínez, A., et al. (2008). Expression of nitrotyrosine and oxidative consequences in the trabecular meshwork of patients with primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:2506-2511.

Ferrer, E. (2006). Trabecular meshwork as a new target for the treatment of glaucoma. *Drug News Perspect* 19 151-158.

Food and Drug Administration (US). (2009). Rimonabant briefing document : Endocrine and metabolic drugs advisory committee meeting. NDA 21-888.

Fuchshofer, R., Ernst, R., Tamm, E.R. (2009) Modulation of extracellular matrix turnover in the trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 88:683-688.

Furrer, P., J. Berger, et al. (2001). A comparative study of the ocular tolerance of 3 timolol-based preparations: the influence of preservatives on ocular tolerance. *J Fr Ophtalmol* 24:3-9.

G

Ganem, S., Y. Lachkar, et al., Eds. (1992). *Ophthalmologie clinique*. Paris, Arnette.

Garcia-Valenzuela, E., Shareef, S., et al. (1995). Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 61:33-44.

Garton, K.J., Gough, P.J., et al. (2001) Tumor necrosis factor- α converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem* 276:37993–38001.

Gasiorowskia, J.Z., Russell, P. (2009). Biological properties of trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 88:671-675.

Gasset, A. R., Y. Ishii, et al. (1974). Cytotoxicity of ophthalmic preservatives. *Am J Ophthalmol* 78:98-105.

Geissmann, F., Jung, S., Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19:71-82.

Gill, K. S., J. Yannariello-Brown, et al. (1997). ICAM-1 expression in corneal epithelium of a patient with vernal keratoconjunctivitis: case report. *Cornea* 16:107-111.

Goda, S., Imai, T., et al. (2000). CX3C-chemokine fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 164:4313-4320.

Gordon, M. O., J. A. Beiser, et al. (2002). The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 120:714-720.

Grierson, I., Howes, R.C. (1987). Age-related depletion of the cell population in the human trabecular meshwork. *Eye* 1:204-210.

Guglielminetti, E., S. Barabino, et al. (2002). HLA-DR expression in conjunctival cells after latanoprost. *J Ocul Pharmacol Ther* 18:1-9.

Gupta, S.K., Pillarisetti, K. (1999). Cutting edge: CXCR4-Lo: molecular cloning and functional expression of a novel human CXCR4 splice variant. *J Immunol* 163:2368-2372.

H

Hamard, P., Valtot, F., et al. (2002). Confocal microscopic examination of trabecular meshwork removed during ab externo trabeculectomy. *Br J Ophthalmol* 86:1046-1052.

Hamard, P., Blondin, C., et al. (2003). In vitro effects of preserved and unpreserved antiglaucoma drugs on apoptotic marker expression by human trabecular cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 241:1037-1043.

Haskell, C.A., Hancock, W.W., et al. (2001). Targeted deletion of CX(3)CR1 reveals a role for fractalkine in cardiac allograft rejection. *J Clin Invest* 108:679-688.

Heise, C.E., Pahuja, A., et al. (2005). Pharmacological characterization of CXC chemokine receptor 3 ligands and a small molecule antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 313:1263-1271.

Hernandez, M.R., Weinstein, B.I., et al. (1987) Human trabecular meshwork cells in culture: Morphology and extracellular matrix components. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28:1655-1660.

Hernandez, M. R. (2000). The optic nerve head in glaucoma: role of astrocytes in tissue remodeling. *Prog Retin Eye Res* 19:297-321.

Herreras, J. M., J. C. Pastor, et al. (1992). Ocular surface alteration after long-term treatment with an antiglaucomatous drug. *Ophthalmology* 99(7):1082-1088.

Hong, J., Bielory, L. (2009). Allergy to Ophthalmic preservatives. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 9:447-453.

Hoogewerf, A.J., Kuschert, G.S., et al. (1997). Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry* 36:13570-13578.

Horuk, R. (2001). Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 12:313-335.

Hosokawa, Y., Hosokawa, I., et al. (2005). CXCL12 and CXCR4 expression by human gingival fibroblasts in periodontal disease. *Clin Exp Immunol* 141:467-474.

Hosseini, M., Rose, A.Y., et al. (2006). IL-1 and TNF induction of matrix metalloproteinase-3 by c-Jun N-terminal kinase in trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:1469-1476.

I

Ichijima, H., Petroll, W.M., et al. (1992). Confocal microscopic studies of living rabbits cornea treated with benzalkonium chloride. *Cornea* 11:221-225.

Imai, T., Hieshima, K., et al. (1997). Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 91:521-530.

Imaizumi, T., Yoshida, H., Satoh, K. (2004). Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* 11:15-21.

Izzotti, A., Bagnis, A., Sacca, S.C. (2006). The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutat Res* 612:105–114.

Izzotti, A., Saccà, S.C., et al. (2010). Mitochondrial damage in the trabecular meshwork of patients with glaucoma. *Arch Ophthalmol* 128:724-730.

J

Jaenen, N., C. Baudouin, et al. (2007). Ocular symptoms and signs with preserved and preservative-free glaucoma medications. *Eur J Ophthalmol* 17:341-349.

Jones, R.F., Maurice, D.M. (1966). New methods of measuring the rate of aqueous flow in man with fluorescein. *Exp Eye Res* 5:208-220.

Jopling, L.A., Watt, G.F., et al. (2007). Analysis of the pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship of a small molecule CXCR3 antagonist, NBI-74330, using a murine CXCR3 internalization assay. *Br J Pharmacol* 152:1260-1271.

Jung, S., Aliberti, J., et al. (2000). Analysis of fractalkine receptor CX3CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 20:4106-4114.

Jung, Y., Wang, J., et al. (2006). Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts a possible mechanism for stem cell homing. *Bone* 38:497-508.

K

Kahn, H. A. and R. C. Milton (1980). Alternative definitions of open-angle glaucoma. Effect on prevalence and associations in the Framingham eye study. *Arch Ophthalmol* 98(12):2172-2177.

Kahook, M. Y. and R. J. Noecker (2008). Comparison of corneal and conjunctival changes after dosing of travoprost preserved with sofZia, latanoprost with 0.02% benzalkonium chloride, and preservative-free artificial tears. *Cornea* 27:339-343.

Kass, M.A., Heuer, D.K., et al. (2002). The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 120:701-713.

Kezic, J., McMenamin, P.G. (2008). Differential turnover rates of monocyte-derived cells in varied ocular tissue microenvironments. *J Leukol Biol* 84:721-729.

Kezic, J., Xu, H., et al. (2008). Retinal microglia and uveal tract dendritic cells and macrophages are not CX3CR1 dependent in their recruitment and distribution in the young mouse eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:1599-1608.

Khan, A. O., Latimer, B. (2004). Successful use of topical cysteamine formulated from the oral preparation in a child with keratopathy secondary to cystinosis. *Am J Ophthalmol* 138:674-675.

Khan, A., Greenman, J., Archibald, S.J. (2007). Small molecule CXCR4 chemokine receptor antagonists: developing drug candidates. *Curr Med Chem* 14:2257-2277.

Khan, M.Z., Brandimarti, R., et al. (2008). The chemokine CXCL12 promotes survival of postmitotic neurons by regulating Rb protein. *Cell Death Differ* 15:1663-1672.

Kinoshita, S., T. C. Kiorpes, et al. (1983). Goblet cell density in ocular surface disease. A better indicator than tear mucin. *Arch Ophthalmol* 101:1284-1287.

Klaassen-Broekema, N., Mackor, A.J., van Bijsterveld, O.P. (1992). The diagnostic power of the tests for tear gland related keratoconjunctivitis sicca. *Neth J Med* 40:113-116.

Klareskog, L., U. Forsum, et al. (1979). Expression of Ia antigen-like molecules on cells in the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18:310-313.

L

Lapidot, T., Dar, A., Kollet, O. (2005). How do stem cells find their way home? *Blood* 106:1901-1910.

Leung, E. W., F. A. Medeiros, et al. (2008). Prevalence of ocular surface disease in glaucoma patients. *J Glaucoma* 17:350-355.

Levrat, F., P. J. Pisella, et al. (1999). Clinical tolerance of antiglaucoma eyedrops with and without a preservative. Results of an unpublished survey in Europe. *J Fr Ophtalmol* 22:186-191.

Li, G., Luna, C., et al. (2007). Sustained stress response after oxidative stress in trabecular meshwork cells. *Mol Vis* 13:2282-2288.

Li, M., Ransohoff, R.M. (2008). Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology. *Prog Neurobiol* 84:116-131.

Liang, H., F. Brignole-Baudouin, et al. (2008). Reduction of quaternary ammonium-induced ocular surface toxicity by emulsions: an in vivo study in rabbits. *Mol Vis* 14:204-216.

Lim, K.S., Nau, C.B., et al. (2008). Mechanism of action of bimatoprost, latanoprost, and travoprost in healthy subjects. A crossover study. *Ophthalmology* 115:790-795.

Lu, P., Li, L., et al. (2008). Protective roles of the fractalkine/CX3CL1-CX3CR1 interactions in alkali-induced corneal neovascularization through enhanced antiangiogenic factor expression. *J Immunol* 180:4283-4291.

Lu, P., Li, L., et al. (2009). Opposite roles of CCR2 and CX3CR1 macrophages in alkali-induced corneal neovascularization. *Cornea* 28:562-569.

Lu, Z., Overby, D.R., et al. (2008). The mechanism of increasing outflow facility by rho-kinase inhibition with Y-27632 in bovine eyes. *Exp Eye Res* 86:271-281.

Lucas, A.D., Chadwick, N., et al. (2001). The transmembrane form of the CX3CL1 chemokine fractalkine is expressed predominantly by epithelial cells in vivo. *Am J Pathol* 158:855-866.

Luna, C., Li, G., et al. (2009). Role of miR-29b on the regulation of the extracellular matrix in human trabecular meshwork cells under chronic oxidative stress. *Mol Vis* 15:2488-2497.

Luster, A.D. (1998). Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338:436-445.

M

- Mackenzie, P. and G. Cioffi (2008). How does lowering of intraocular pressure protect the optic nerve? *Surv Ophthalmol* 53 Suppl1:S39-43.
- Maksym, R.B., Tarnowski, M., et al. (2009). The role of stromal-derived factor-1--CXCR7 axis in development and cancer. *Eur J Pharmacol* 625:31-40.
- Mansberger, S. L. and G. A. Cioffi (2006). The probability of glaucoma from ocular hypertension determined by ophthalmologists in comparison to a risk calculator. *J Glaucoma* 15:426-431.
- Marchese, A., Benovic, J.L. (2001). Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem* 276:45509-45512.
- McDermott, D.H., Fong, A.M., et al. (2003). Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. *J Clin Invest* 111:1241-1250.
- McQuibban, G.A., Gong, J.H., et al. (2000). Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 289:1202-1206.
- McQuibban, G.A., Butler, G.S., et al. (2001). Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXCR3 chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem* 276:43503-43508.
- Medina, J., Collins, T., et al. (2004). Discovery and Development of a CXCR3 antagonist T487 as therapy for Th1-mediated immune disorders. 29th National Medicinal Chemistry Symposium.
- Mellado, M., Rodríguez-Frade, J.M., et al. (1998). The chemokine monocyte chemoattractant protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor. *J Immunol* 161:805-813.
- Meucci, O., Fatatis, A., et al. (2000). Expression of CX3CR1 chemokine receptors on neurons and their role in neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8075-8080.
- Mietz, H., U. Schlotzer-Schrehardt, et al. (1997). Early conjunctival changes following treatment with metipranolol and preservatives are not reversible with dexamethasone. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235:452-459.
- Miljanovic, B., R. Dana, et al. (2007). Impact of dry eye syndrome on vision-related quality of life. *Am J Ophthalmol* 143:409-415.
- Moser, B., Wolf, M., et al. (2004). Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 25:75-84.
- Muehlhoefer, A., Saubermann, L.J., et al. (2000). Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa. *J Immunol* 164:3368-3376.
- Muller, A., Homey, B., et al. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410:50-56.

Mueller, A., Strange, P.G. (2004). CCL3, acting via the chemokine receptor CCR5, leads to independent activation of Janus kinase 2 (JAK2) and Gi proteins. *FEBS Lett* 570:126-132.

N

Nagasawa, T., Kikutani, H., Kishimoto, T. (1994). Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2305-2309.

Nduaguba, C. and R. K. Lee (2006). Glaucoma screening:current trends, economic issues, technology, and challenges. *Curr Opin Ophthalmol* 17(2):142-152.

Nelson, J. D. and J. C. Wright (1984). Conjunctival goblet cell densities in ocular surface disease. *Arch Ophthalmol* 102:1049-1051.

Nissirios, N., Chanis, R., et al. (2008). Comparison of anterior segment structures in two rat glaucoma models:an ultrasound biomicroscopic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:2478-2482.

Noecker, R.J., Herrygers, L.A., Anwaruddin, R. (2004). Corneal and conjunctival changes caused by commonly used glaucoma medications. *Cornea* 23:490-496.

O

Ohia, S.E., Opere, C.A., Leday, A.M.(2005). Pharmacological consequences of oxidative stress in ocular tissues. *Mutat Res* 579:22-36.

P

Pang, I.H., Shade, D.L., et al. (1994). Preliminary characterization of a transformed cell strain derived from human trabecular meshwork. *Curr Eye Res* 13:51-63.

Park, H.Y., Lee, N.Y., et al. (2008). Intraocular pressure lowering, change of antiapoptotic molecule expression, and neuroretinal changes by dorzolamide 2%/timolol 0.5% combination in a chronic ocular hypertension rat model. *J Ocul Pharmacol Ther* 24:563-571.

Pauly, A., M. Meloni, et al. (2009). Multiple endpoint analysis of the 3D-reconstituted corneal epithelium after treatment with benzalkonium chloride:early detection of toxic damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:1644-1652.

Pease, J.E., Horuk, R.(2005). CCR1 antagonists in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs* 14:785-796.

Pels, E. and R. van der Gaag (1984). HLA-A,B,C, and HLA-DR antigens and dendritic cells in fresh and organ culture preserved corneas. *Cornea* 3:231-239.

Peng, H., Erdmann, N., et al. (2006). HIV-1-infected and/or immune activated macrophages regulate astrocyte SDF-1 production through IL-1beta. *Glia* 54:619-629.

Pfeiffer, N. (1997). Dorzolamide:development and clinical application of a topical carbonic anhydrase inhibitor. *Surv Ophthalmol* 42:137-151.

Philipp, W. and W. Gottinger (1991). T6-positive Langerhans cells in diseased corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:2492-2497.

Pillai, R.G., Beutelspacher, S.C., et al. Upregulation of chemokine expression in murine cornea due to mechanical trauma or endotoxin. *Br J Ophthalmol* 92:259-264.

Pillarsetti, K., Gupta, S.K. (2001). Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1):SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. *Inflammation* 25:293-300.

Pisella, P. J., K. Fillacier, et al. (2000). Comparison of the effects of preserved and unpreserved formulations of timolol on the ocular surface of albino rabbits. *Ophthalmic Res* 32:3-8.

Pisella, P. J., P. Pouliquen, et al. (2002). Prevalence of ocular symptoms and signs with preserved and preservative free glaucoma medication. *Br J Ophthalmol* 86:418-423.

Pisella, P. J., C. Debbasch, et al. (2004). Conjunctival proinflammatory and proapoptotic effects of latanoprost and preserved and unpreserved timolol:an ex vivo and in vitro study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:1360-8.

Potter, D. E., C. E. Crosson, et al. (1990). Review:alpha 2 and DA2 agonists as antiglaucoma agents:comparative pharmacology and clinical potential. *J Ocul Pharmacol* 6:251-257.

Proudfoot, A.E. (2002). Chemokine receptors:multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2:106-115.

Q

Quigley, H. A. (1996). Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol* 80:389-393.

Quigley, H.A., Broman, A.T. (2006). The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 90:262-267.

R

Ransohoff, R.M., Tani, M. (1998). Do chemokines mediate leukocyte recruitment in post-traumatic CNS inflammation? *Trends Neurosci* 21:154-159.

Raoul, W., Keller, N., et al. (2008). Role of the chemokine receptor CX3CR1 in the mobilization of phagocytic retinal microglial cells. *J Neuroimmunol* 198:56-61.

Raoul, W., Auvynet, C., et al. (2010). CCL2/CCR2 and CX3CL1/CX3CR1 chemokine axes and their possible involvement in age-related macular degeneration. *J Neuroinflammation* 7:87.

Raychaudhuri, S.P., Jiang, W.Y., Farber, E.M. (2001). Cellular localization of fractalkine at sites of inflammation:antigen-presenting cells in psoriasis express high levels of fractalkine. *Br J Dermatol* 144:1105-1113.

Renard, J. P., J. M. Giraud, et al. (2005). Practical assessment. Ocular hypertension. *J Fr Ophtalmol* 28 Spec No 2:2S13-2S16.

Rimaniol, A.-C., Till, S.J., et al. (2003). The CX3C chemokine fractalkine in allergic asthma and rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 112:1139-1146.

- Rimland, J., Xin, W., et al. (1991). Sequence and expression of a neuropeptide Y receptor cDNA. *Mol Pharmacol* 40:869-875.
- Rohen, J.W., Lutjen-Drecoll, E., et al. (1993). Ultrastructure of the trabecular meshwork in untreated cases of primary open-angle glaucoma. *Exp Eye Res* 56:683-692.
- Rollins, B.J. (1997). Chemokines. *Blood* 90:909-928.
- Romagnani, P., Annunziato, F., et al. (2001). Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J Clin Invest* 107:53-63.
- Romanet, J.-P. and C. Noel, Eds. (1998). *Humeur aqueuse et pression intra-oculaire*. Encyclopédie Médico Chirurgicale. Paris, Elsevier.
- Rossi, D., Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18:217-242.
- Rostene, W., Kitabgi, P., Parsadaniantz, S.M. (2007). Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nat Rev Neurosci* 8:895-903.
- Rostène, W., Guyon, A., et al. (2011). Chemokines and chemokine receptors: new actors in neuroendocrine regulations. *Front Neuroendocrinol* 32:10-24.
- Ruth, J.H., Volin, M.V., et al. (2001). Fractalkine, a novel chemokine in rheumatoid arthritis and in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 44:1568-1581.

S

- Sacca, S.C., Izzotti, A., et al. (2007). Glaucomatous outflow pathway and oxidative stress. *Exp Eye Res* 84:389-399.
- Saccà, S.C., Izzotti, A. (2008). Oxidative stress and glaucoma: injury in the anterior segment of the eye. *Prog Brain Res* 173:385-407.
- Sadir, R., Imberty, A., et al. (2004). Heparan sulfate/heparin oligosaccharides protect stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against proteolysis induced by CD26/dipeptidyl peptidase IV. *J Biol Chem* 279:43854-43860.
- Samples, J. R., P. S. Binder, et al. (1989). The effect of epinephrine and benzalkonium chloride on cultured corneal endothelial and trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 49:1-12.
- Sawada, H., Fukuchi, T., et al. (2010). Tumor necrosis factor-alpha concentrations in the aqueous humor of patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:903-906.
- Schaerli, P., Moser, B. (2005). Chemokines: control of primary and memory T-cell traffic. *Immunol Res* 35:57-74.
- Schein, O. D., P. L. Hibberd, et al. (1992). Microbial contamination of in-use ocular medications. *Arch Ophthalmol* 110:82-85.
- Seiler, T. and J. Wollensak (1985). The resistance of the trabecular meshwork to aqueous humor outflow. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 23:88-91.

Sherwood, M.B., Grierson, I., et al. (1989). Long-term morphologic effects of antiglaucoma drugs on the conjunctiva and Tenon's capsule in glaucomatous patients. *Ophthalmology* 96:327-335.

Sherwood, M.E., Richardson, T.M., Epstein, D.L. (1988). Phagocytosis by trabecular meshwork cells: Sequence of events in cats and monkeys. *Exp Eye Res* 46:881-895.

Shifera, A.S., Trivedi, S., et al. (2010). Constitutive secretion of chemokines by cultured human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 91:42-47.

Shirozu, M., Nakano, T., et al. (1995). Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28:495-500.

Sommer, A. (1989). Intraocular pressure and glaucoma. *Am J Ophthalmol* 107:186-188.

Sommer, A., J. M. Tielsch, et al. (1991). Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. The Baltimore Eye Survey. *Arch Ophthalmol* 109:1090-1095.

Son, B.R., Marquez-Curtis, L.A., et al. (2006). Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells* 24:1254-1264.

Strieter, R.M., Burdick, M.D., et al. (2005). CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:593-609.

Sui, Y., Stehno-Bittel, L., et al. (2006). CXCL10-induced cell death in neurons: role of calcium dysregulation. *Eur J Neurosci* 23:957-964.

T

Takahashi, N. (1982). Quantitative cytotoxicity of preservatives evaluated in cell culture with Chang's human conjunctival cells--effect of temperature on cytotoxicity. *Jpn J Ophthalmol* 26:234-238.

Tashiro, K., Tada, H., et al. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 261:600-603.

Tektas, O.Y., Lütjen-Drecoll, E. (2009). Structural changes of the trabecular meshwork in different kinds of glaucoma. *Exp Eye Res* 88:769-775.

Thelen, M., Thelen, S. (2008). CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? *J Neuroimmunol* 198:9-13.

Toris C.B., Yablonski M.E., et al. (1995). Prostaglandin A2 increases uveoscleral outflow and trabecular outflow facility in the cat. *Exp Eye Res* 61:649-657.

Toris, C.B., Zhan, G., et al. (2007). Effects of travoprost on aqueous humor dynamics in patients with elevated intraocular pressure. *J Glaucoma* 16:189-195.

Tripathi, B. J., R. C. Tripathi, et al. (1992). Cytotoxicity of ophthalmic preservatives on human corneal epithelium. *Lens Eye Toxic Res* 9:361-375.

Tripathi, R.C., Li, J., et al. (1994). Aqueous humor in glaucomatous eyes contains an increased level of TGF- β 2. *Exp Eye Res* 58:723–727.

Turacli, E., K. Budak, et al. (1997). The effects of long-term topical glaucoma medication on conjunctival impression cytology. *Int Ophthalmol* 21:27-33.

U

Urcola, J.H., Hernandez, M., Vecino, E. (2006). Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp Eye Res* 83:429-437.

V

Valenzuela-Fernandez, A., Planchenault, T., et al. (2002). Leukocyte elastase negatively regulates Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 binding and functions by amino-terminal processing of SDF-1 and CXCR4. *J Biol Chem* 277:15677-15689.

van der Valk, R., C. A. Webers, et al. (2005). Intraocular pressure-lowering effects of all commonly used glaucoma drugs: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Ophthalmology* 112:1177-1185.

van Wanrooij, E.J., de Jager, S.C., et al. (2008). CXCR3 antagonist NBI-74330 attenuates atherosclerotic plaque formation in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:251-257.

Vergote, D., Butler, G.S., et al. (2006). Proteolytic processing of SDF-1 α reveals a change in receptor specificity mediating HIV-associated neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19182-19187.

Verzija, D., Storelli, S., et al. (2008). Noncompetitive antagonism and inverse agonism as mechanism of action of nonpeptidergic antagonists at primate and rodent CXCR3 chemokine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 325:544-555.

Villain, M. A. (2005). The epidemiology of glaucoma. *J Fr Ophtalmol* 28 Spec No 2:2S9-2S12.

Villalba, S., Salvucci, O., et al. (2003). Serum inactivation contributes to the failure of stromal-derived factor-1 to block HIV-I infection in vivo. *J Leukoc Biol* 74:880-888.

W

Walser, T.C., Rifat, S., et al. (2006). Antagonism of CXCR3 inhibits lung metastasis in a murine model of metastatic breast cancer. *Cancer Res* 66:7701-7707.

Watson, P. G. (1972). Surgery of the glaucomas. *Br J Ophthalmol* 56:299-306.

Wax, M. B., G. Tezel, et al. (1998). Clinical and ocular histopathological findings in a patient with normal-pressure glaucoma. *Arch Ophthalmol* 116:993-1001.

Weinreb, R. N., C. B. Toris, et al. (2002). Effects of prostaglandins on the aqueous humor outflow pathways. *Surv Ophthalmol* 47 Suppl 1:S53-64.

Weinreb, R. N., Y. Kitazawa, et al. (2000). *Glaucoma in the 21st century*. Barcelona, Espagne, Mosby international Ltd, Harcourt Health Communications.

Wildenberg, M.E., van Helden-Meeuwssen, C.G., et al. (2008). Altered fractalkine cleavage potentially promotes local inflammation in NOD salivary gland. *Arthritis Res Ther* 10:69.

Wilson, W. S., A. J. Duncan, et al. (1975). Effect of benzalkonium chloride on the stability of the precorneal tear film in rabbit and man. *Br J Ophthalmol* 59:667-669.

Wolpe, S.D., Cerami A. (1989). Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. *FASEB J* 3:2565-2573.

Y

Yablonski, M.E., Zimmerman, T.J., et al. (1978). A fluorophotometric study of the effect of topical timolol on aqueous humor dynamics. *Exp Eye Res* 25:135-142.

Yalvac, I. S., G. Gedikoglu, et al. (1995). Effects of antiglaucoma drugs on ocular surface. *Acta Ophthalmol Scand* 73:246-248.

Yang, J., Richmond, A. (2004). The angiostatic activity of interferon-inducible protein-10/CXCL10 in human melanoma depends on binding to CXCR3 but not to glycosaminoglycan. *Mol Ther* 9:846-855.

You, J.J., Yang, C.H., et al. (2007). Fractalkine, a CX3C chemokine, as a mediator of ocular angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:5290-5298.

Yu, A.L., Birke, K., et al. (2010). TGF- β 2 induces senescence-associated changes in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:5718-5723.

Yu, L., Cecil, J., et al. (1995). Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene* 374:174-179.

Yu, S., Tanabe, T., Yoshimura, N. (2006). A rat model of glaucoma induced by episcleral vein ligation. *Exp Eye Res* 83:758-770.

Z

Zanon-Moreno, V., Marco-Ventura, P., et al. (2008). Oxidative stress in primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma* 17:263-268.

Zhang, K., McQuibban, G.A., et al. (2003). HIV-induced metalloproteinase processing of the chemokine stromal cell derived factor-1 causes neurodegeneration. *Nat Neurosci* 6:1064-1071.

Zhang, Y., Toris, C.B., et al. (2009). Morphological and hydrodynamic correlates in monkey eyes with laser induced glaucoma. *Exp Eye Res* 89:748-756.

Zhao, X., Ramsey, K.E., et al. (2004). Gene and protein expression changes in human trabecular meshwork cells treated with transforming growth factor- β . *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:4023-4034.

