



HAL
open science

Rôle pro-inflammatoire des cellules épithéliales de la conjonctive dans un modèle *in vitro* de sécheresse oculaire

Elise Warcoin

► **To cite this version:**

Elise Warcoin. Rôle pro-inflammatoire des cellules épithéliales de la conjonctive dans un modèle *in vitro* de sécheresse oculaire. Organes des sens. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066023 . tel-01360553

HAL Id: tel-01360553

<https://theses.hal.science/tel-01360553>

Submitted on 6 Sep 2016

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

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

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE
École doctorale 394 : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Présentée par
Élise WARCOIN

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

RÔLE PRO-INFLAMMATOIRE DES CELLULES ÉPITHÉLIALES
DE LA CONJONCTIVE DANS UN MODÈLE *IN VITRO*
DE SÉCHERESSE OCULAIRE

Présentée et soutenue publiquement le 25/01/2016

Devant un jury composé de :

Pr Bahram BODAGHI	Président
Pr Armelle BAEZA	Rapporteur
Pr Marc LABETOULLE	Rapporteur
Dr Sophie ACHARD	Examinatrice
Dr Martine CLARET	Examinatrice
Dr Françoise BRIGNOLE-BAUDOUIN	Directrice de thèse

L'ensemble de ce travail a été réalisé à l'Institut de la Vision, dans le Département Thérapeutique, au sein de l'équipe "Chimiokines et physiopathologie du segment antérieur de l'œil" du Professeur Christophe Baudouin et du Docteur Stéphane Melik-Parsadaniantz. Je tiens à remercier tous ceux qui de près ou de loin ont participé à l'élaboration de ce travail.

Je remercie en premier lieu les membres du jury : le Docteur Sophie Achard, le Professeur Armelle Baeza, le Professeur Bahram Bodaghi, le Docteur Martine Claret et le Professeur Marc Labetoulle, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et de juger ce travail. Merci pour votre lecture critique de ce manuscrit.

Je remercie particulièrement le Docteur Françoise Brignole-Baudouin qui a encadré ce travail de thèse. Merci de m'avoir accueillie il y a maintenant 9 ans dans le laboratoire de toxicologie de la Faculté de Pharmacie de Paris, de m'avoir ainsi permis de découvrir le monde de la recherche et de m'avoir donné envie de continuer. Merci pour ta bienveillance, ta confiance et ton soutien tout au long de cette thèse. Je suis admirative de l'enthousiasme et la passion que tu communique, que ce soit au laboratoire de recherche ou en tant qu'enseignante de toxicologie.

Je remercie également grandement la société Horus Pharma et sa présidente, le Docteur Martine Claret, ainsi que le Docteur Claude Claret. Merci de m'avoir financée durant ces 3 années de thèse et particulièrement d'avoir accepté de modifier ce financement à mi-parcours de celle-ci. Travailler avec vous a été un plaisir. Je remercie aussi le Docteur Carole Gard, pour sa gentillesse et son regard sur mes travaux.

Je souhaite remercier le Professeur Christophe Baudouin de m'avoir accueillie dans son équipe et pour son soutien constant tout au long de ma thèse. Je vous suis très reconnaissante de votre disponibilité pour discuter de l'avancement de mon travail, malgré votre emploi du temps chargé. Vos encouragements et vos suggestions pour guider mes travaux m'ont été très précieux.

Je remercie particulièrement le Professeur Jean Michel Warnet pour sa relecture critique de ce manuscrit qui m'a beaucoup aidée.

Je remercie aussi le Professeur William Rostène pour son regard critique mais toujours bienveillant sur mes travaux.

Je remercie également le Professeur José-Alain Sahel de m'avoir accueillie au sein de cet institut.

Enfin, je remercie énormément l'ensemble des membres de l'équipe. Karima, un grand merci pour tes conseils et tes avis qui m'ont enrichie durant cette thèse, ta relecture du manuscrit et ton aide lors de l'impression de celui-ci. Merci Hong pour ta bonne humeur constante et la gaité que tu amènes à chacune de tes venues au laboratoire, ainsi que pour tes connaissances partagées sur la sécheresse oculaire. Merci Luisa, notamment pour tes conseils en cytométrie en flux et en culture cellulaire. Merci Anne-Laure, pour ton aide pour certaines expériences et pour ta compagne, notamment en

culture cellulaire. Merci également à Elodie. Je remercie de même le Docteur Stéphane Melik-Parsadaniantz, le Docteur Anabelle Réaux-Le Goazigo, le Professeur Antoine Labbé, le Docteur Alexandre Denoyer, Christophe, Michael-Adrien, Fanny, Meryem, Pierre et Matthieu.

Un merci spécial pour mes collègues de laboratoire qui ont permis à ces 3 années de thèse de combiner travaux de recherches passionnants et bons moments. Rien que pour votre rencontre, cette thèse est déjà pour moi une réussite. Merci Georges, Pierre, Nelson, Anaïs et Shulong. Merci pour votre soutien et vos encouragements. Votre aide et vos conseils concernant mes expérimentations m'ont été très précieux. Merci pour le reste aussi. Discuter avec vous, que ce soit de résultats scientifiques ou autres, rire avec vous, resteront parmi mes meilleurs souvenirs.

Sont nominés également dans cette catégorie : Melissa, Barbara, David, Marcela et Elric.

Pour finir, je remercie également l'ensemble de ma famille, de mes amis, et Ben, pour leur soutien tout au long de ce travail.

TABLES DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	9
LISTE DES FIGURES.....	12
LISTE DES TABLEAUX	13
AVANT-PROPOS.....	14
1. GÉNÉRALITÉS	17
1.1. RAPPELS SUR LA SÉCHERESSE OCULAIRE	18
1.1.1. Anatomie et rôles de l'unité fonctionnelle lacrymale.....	18
1.1.1.1. Les paupières.....	18
1.1.1.2. Les glandes lacrymales et le nerf lacrymal.....	19
1.1.1.3. La surface oculaire.....	19
1.1.1.3.1. Le film lacrymal	20
1.1.1.3.1.1. Composition et rôle du film lacrymal.....	20
1.1.1.3.1.2. Régulation du film lacrymal.....	23
1.1.1.3.2. La conjonctive.....	23
1.1.1.3.3. La cornée	24
1.1.2. Définition de la sécheresse oculaire.....	26
1.1.3. Épidémiologie de la sécheresse oculaire et facteurs de risque	26
1.1.4. Classification - Étiologies de la sécheresse oculaire	28
1.1.4.1. Sécheresses oculaires par hyposécrétion.....	28
1.1.4.1.1. Pathologies dysimmunitaires	29
1.1.4.1.2. Pathologies non dysimmunitaires.....	29
1.1.4.2. Sécheresses oculaires par instabilité du film lacrymal.....	30
1.1.4.2.1. Causes palpébrales.....	30
1.1.4.2.2. Causes extrinsèques.....	30
1.1.5. Diagnostic de la sécheresse oculaire.....	31
1.1.5.1. Interrogatoire	31
1.1.5.2. Examen clinique et examen de la surface oculaire	32
1.1.5.2.1. Examen clinique de l'unité fonctionnelle lacrymale	32
1.1.5.2.2. Examen biologique de l'unité fonctionnelle lacrymale	33
1.1.5.2.2.1. Analyse des larmes.....	34
1.1.5.2.2.2. Analyse des empreintes conjonctivales	35

1.1.5.3. Examens d'imagerie et examens fonctionnels.....	36
1.1.6. Traitement de la sécheresse oculaire.....	37
1.1.6.1. Les substituts lacrymaux	37
1.1.6.2. Les moyens mécaniques de rétention lacrymale	38
1.1.6.3. Le collyre de sérum autologue	38
1.1.6.4. Thérapeutiques anti-inflammatoires locale et orale.....	38
1.2. HYPEROSMOLARITÉ ET INFLAMMATION, AU CŒUR DE LA SÉCHERESSE OCULAIRE	39
1.2.1. Effets intracellulaires induits par l'hyperosmolarité	39
1.2.1.1. Arrêt du cycle cellulaire et dommages à l'ADN.....	41
1.2.1.2. Régulation du volume cellulaire.....	42
1.2.1.2.1. Systèmes de transport impliqués dans le RVI et le RVD	43
1.2.1.2.2. Aquaporines	44
1.2.1.3. Le facteur de transcriptions NFAT5.....	45
1.2.1.4. La mort cellulaire induite par un stress hyperosmolaire.....	47
1.2.1.5. Effets pro-inflammatoires de l'hyperosmolarité.....	47
1.2.2. Sécheresse oculaire et inflammation - Rôle de l'hyperosmolarité	47
1.2.2.1. L'inflammation.....	47
1.2.2.1.1. Généralités	47
1.2.2.1.2. Les marqueurs de l'inflammation étudiés dans la sécheresse oculaire	49
1.2.2.1.2.1. Les médiateurs moléculaires de l'inflammation	49
1.2.2.1.2.2. Les médiateurs cellulaires de l'inflammation.....	50
1.2.2.1.2.3. La voie particulière de l'inflammasome, plateforme d'activation d'IL-1 β	51
1.2.2.2. Données expérimentales sur la sécheresse oculaire	53
1.2.2.2.1. Données humaines.....	54
1.2.2.2.1.1. Méthodes de prélèvement et techniques d'études.....	54
1.2.2.2.1.2. Résultats en termes d'inflammation	55
1.2.2.2.2. Données expérimentales des modèles de sécheresse oculaire	57
1.2.2.2.2.1. Modèles animaux <i>in vivo</i>	57
1.2.2.2.2.1.1. Les différents types de modèles animaux.....	57
1.2.2.2.2.1.1.1. Modèles chimiques entraînant une hyposécrétion lacrymale.....	57
1.2.2.2.2.1.1.2. Modèles physiques entraînant une hyposécrétion lacrymale	58
1.2.2.2.2.1.1.3. Modèles expérimentaux par excès d'évaporation.....	58
1.2.2.2.2.1.1.4. Modèles expérimentaux par instillation hyperosmolaire	59
1.2.2.2.2.1.1.5. Modèles de sécheresse oculaire auto-immune	59

1.2.2.1.2.1.1.6. Autres modèles de sécheresse oculaire	59
1.2.2.1.2.1.2. Résultats des modèles animaux sur l'inflammation.....	60
1.2.2.1.2.2. Modèles <i>in vitro</i>	64
1.2.2.3. Thérapeutiques anti-inflammatoires	66
1.2.2.3.1. Ciclosporine	67
1.2.2.3.1.1. Mécanisme d'action	67
1.2.2.3.1.2. Effets rapportés sur la sécheresse oculaire.....	69
1.2.2.3.1.3. Problématique des formulations de collyres de CsA	70
1.2.2.3.2. Glucocorticoïdes.....	70
1.2.2.3.2.1. Mécanisme d'action	71
1.2.2.3.2.2. Effets rapportés sur la sécheresse oculaire.....	73
1.2.2.3.2.3. Problématique de l'utilisation au long cours des glucocorticoïdes ophthalmiques.....	73
1.2.2.3.2.4. Comparaison avec les effets des anti-inflammatoires non stéroïdiens	74
1.2.2.3.3. Dérivés des tétracyclines.....	75
1.2.2.3.3.1. Mécanisme d'action	75
1.2.2.3.3.2. Effets rapportés sur la sécheresse oculaire.....	76
1.2.2.4. Le cercle vicieux de la sécheresse oculaire	77
2. RÉSULTATS.....	81
2.1. EFFETS PRO-INFLAMMATOIRES DE L'HYPEROSMOLARITÉ ET DU BAK	83
2.1.1. Introduction.....	83
2.1.2. Matériel et Méthodes	83
2.1.3. Résultats	84
2.1.4. Conclusion	84
2.1.5. Article	84
2.2. CARACTÉRISATION DE L'INDUCTION DE CCL2 PAR L'HYPEROSMOLARITÉ - RÔLE DE NFAT5	95
2.2.1. Introduction.....	95
2.2.2. Matériel et Méthodes	96
2.2.3. Résultats	96
2.2.4. Conclusions.....	96
2.2.5. Article	96
2.3. EFFETS DE L'OSMOLARITE SUR L'ACTIVATION DE L'INFLAMMASOME	112
2.3.1. Introduction.....	112
2.3.2. Expériences menées.....	113

2.3.3. Matériel et méthodes.....	114
2.3.4. Résultats	115
2.3.5. Discussion	120
2.3.5.1. Étude de l'inflammation induite par les activateurs de l'inflammasome ou les PAMPs seuls en milieu classique	120
2.3.5.2. Étude de l'effet couplé de l'hyper- ou de l'hypo-osmolarité sur l'inflammation induite par les activateurs de l'inflammasome ou les PAMPs seuls.....	121
2.3.6. Conclusion	124
DISCUSSION-CONCLUSION	126
Les problématiques d'étude de la sécheresse oculaire	127
Rationnel ayant conduit au choix du protocole d'hyperosmolarité	129
Intérêts, critiques et perspectives des résultats obtenus dans ces travaux	130
ANNEXE	135
RÉFÉRENCES	137

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AE	Echangeur Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻
AIM2	<i>Absent In Melanoma 2</i>
AINS	Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
Aire	<i>Autoimmune regulator</i>
AIS	Anti-Inflammatoire Stéroïdien
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
AQP	Aquaporine
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ASC	<i>Apoptosis-related Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3-related</i>
BAK	Chlorure de benzalkonium
BGT1	Transporteur de la bétaine
CALT	<i>Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue</i>
CCL2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
COX2	Cyclooxygénase-2
CMH II	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II
CPA	Cellule Présentatrice de l'Antigène
CsA	Ciclosporine
CX3CL1	<i>Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1</i>
DAMP	<i>Danger /Damage Associated Molecular Pattern</i>
DEQ	<i>Dry Eye Questionnaire</i>
DEWS	<i>Dry Eye Workshop</i>
Dex	Dexaméthasone
DMEM	<i>Dulbecco minimum essential medium</i>
Dox	Doxycycline
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ENaC	<i>Epithelial sodium Channel</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated Kinase</i>
ERO	Espèce Réactive de l'Oxygène
GADD	<i>Growth Arrest and DNA Damage inducible protein</i>
Gro- α	<i>Growth-regulated protein-α</i>
Gro- β	<i>Growth-regulated protein-β</i>
HICC	<i>Hypertonicity-Induced Cation Channels</i>
HLA-DR	<i>Human Leucocyte Antigen-DR</i>
HRT	<i>Heidelberg Retina Tomograph</i>
HSP70	<i>70 kilodalton heat shock protein</i>

$I_{Cl,vol}$	<i>volume-sensitive chlorure channel</i>
$I_{Cl,Ca}$	<i>Ca²⁺-activated chlorure channel</i>
$I_{K,vo}$	<i>volume-sensitive potassium channel</i>
$I_{K,Ca}$	<i>Ca²⁺-activated potassium channel</i>
ICAM-1	<i>Intracellular Adhesion Molecule-1</i>
IL	<i>Interleukine</i>
IFN- γ	<i>Interféron-γ</i>
Ig	<i>Immunoglobuline</i>
JNK	<i>c-Jun NH₂-terminal kinase</i>
KCC	<i>Cotransporteur K⁺/Cl⁻ symport</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte Function-associated Antigen-1</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LTA	<i>Acide lipoteichoic</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MMP	<i>Métalloprotéinase</i>
NFAT	<i>Nuclear Factor of the Activated T cells</i>
NFAT5	<i>Nuclear Factor of the Activated T cells-5</i>
NF κ B	<i>Nuclear Factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NHE	<i>Echangeur Na⁺/H⁺</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NKCC	<i>Cotransporteur Na⁺/K⁺/2Cl⁻</i>
NLR	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-like Receptor</i>
NLRP3	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing Protein 3</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like</i>
NOD	<i>Non-Obese Diabetic</i>
NSC	<i>Na⁺/permeable nonselective cation</i>
OSDI	<i>Ocular Surface Disease Index</i>
ORE	<i>Osmotic Response Element</i>
OREBP	<i>Osmotic Response Element-Binding Protein</i>
p38	<i>Kinase p38 MAPK</i>
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PIK3	<i>Polo-like Kinase 3</i>
PKA	<i>Protéine Kinase A</i>
PKC- α	<i>Protéine Kinase C-α</i>
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RVD	<i>Regulatory Volume Decrease</i>
RVI	<i>Regulatory Volume Increase</i>
SGS	<i>Syndrome de Gougerot-Sjögren</i>
SIDA	<i>Syndrome d'immunodéficience acquise</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SMIT	<i>Transporteur sodium/myo-inositol</i>
SPRR1B	<i>Small Proline-Rich Protein 1B</i>

SPRR2A	<i>Small Proline-Rich Protein 2A</i>
SVF	<i>Sérum de Veau Fœtal</i>
TAUT	<i>Transporteur de la taurine sodium/chlore-dépendant</i>
TBUT	<i>Tear Break up time</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
Th	<i>cellules T effectrices helper</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TonE	<i>Tonicity-responsive Enhancer</i>
TonEBP	<i>Tonicity-responsive Enhancer Binding Protein</i>
Treg	<i>Cellules T régulatrices</i>
TRPV	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid channels</i>
VSOR	<i>Volume-Sensitive Outwardly Rectifying Cl channel</i>
WKD	<i>Wong Kilbourne derivative of Chang conjunctiva</i>

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Schéma de l'unité fonctionnelle lacrymale.

Figure 2. Schéma de la paupière.

Figure 3. Schéma de la surface oculaire.

Figure 4. Schéma du film lacrymal.

Figure 5. Composition du film lacrymal en différentes cytokines.

Figure 6. Les différentes couches de la cornée.

Figure 7. Formule chimique du BAK.

Figure 8. Classification des étiologies de la sécheresse oculaire.

Figure 9. Test de Schirmer.

Figure 10. Test à la fluorescéine.

Figure 11. Test au vert de lissamine.

Figure 12. Test de meibopression.

Figure 13. Dosage de l'osmolarité lacrymale et appareil TearLab™.

Figure 14. Prélèvement de larmes à la pipette de transfert.

Figure 15. Technique classique de prélèvement d'empreinte conjonctivale.

Figure 16. Effets intracellulaires de l'hyperosmolarité.

Figure 17. Délai d'activation des différents mécanismes intracellulaires mis en place lors d'un stress hyperosmolaire.

Figure 18. La cascade des *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs).

Figure 19. Phénomènes de régulation du volume cellulaire (RVD et RVI).

Figure 20. Sites d'expression des AQP dans l'œil.

Figure 21. Différenciation des lymphocytes CD4+ en fonction des cytokines auxquelles ils sont exposés.

Figure 22. Mécanismes cellulaires d'activation de l'inflammasome NLRP3.

Figure 23. Structure chimique de la CsA.

Figure 24. Mécanisme immunosuppresseur de la CsA lié à l'inhibition de la calcineurine.

Figure 25. Formule chimique des glucocorticoïdes.

Figure 26. Mécanismes d'action des glucocorticoïdes.

Figure 27. Structure chimique commune aux dérivés de la tétracycline composée de quatre noyaux cycliques accolés.

Figure 28. Schéma des différents cercles vicieux entretenant la sécheresse oculaire.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Composition normale du film lacrymal.

Tableau 2. Classification de la sévérité de la sécheresse oculaire.

Tableau 3. Cibles moléculaires de NFAT5 induit par l'hyperosmolarité.

Tableau 4. Tableau récapitulant les marqueurs inflammatoires détectés lors d'expérimentations *in vivo* de sécheresse oculaire.

AVANT-PROPOS

La sécheresse oculaire est une pathologie fréquente souvent sous-estimée et sous-diagnostiquée, qui représente pourtant une des causes les plus habituelles de consultation dans les services d'ophtalmologie (1). La fréquence de cette pathologie dans la population des personnes âgées de plus de 50 ans est estimée entre 4 à 17% (2,3). La variabilité importante des fréquences observées dans les différentes études épidémiologiques est liée aux populations étudiées (sexe, âge et ethnie) mais surtout aux critères choisis pour définir une sécheresse oculaire. En effet, cette pathologie présente certaines difficultés de diagnostic car le tableau clinique peut être très variable et est couplé à un important manque de corrélation entre les symptômes rapportés par les patients et les tests cliniques réalisés. De plus, il n'y a actuellement pas de consensus sur la combinaison de tests diagnostiques à effectuer permettant de déterminer la présence de la maladie ou non. La fréquence de cette pathologie augmentant avec l'âge, compte tenu du vieillissement de la population et de l'absence de traitement réellement curatif à l'heure actuelle, la sécheresse oculaire est ainsi vouée à devenir un problème de santé publique grandissant qu'il est nécessaire d'appréhender. De plus, le coût direct de cette pathologie est relativement important variant suivant les études entre 600 dollars en moyenne par patient et par an en Europe (4) et 700-1300 dollars aux États-Unis, en fonction de la sévérité de l'atteinte (5). S'ajoutent des coûts indirects liés aux répercussions de la maladie sur la qualité de vie des patients. En effet, cette pathologie entraîne des symptômes permanents d'inconfort oculaire, de douleur oculaire et de vision trouble (6,7) qui peuvent dans les cas sévères compliquer ou empêcher la réalisation de tâches quotidiennes classiques comme la lecture, la conduite d'un véhicule ou l'utilisation d'un ordinateur par exemple (8). Ces effets peuvent alors être responsables de manifestations d'anxiété chez les patients, voire même entraîner un véritable syndrome dépressif (9). Les coûts indirects de la maladie liés à l'absentéisme, la baisse de productivité et l'impact sur les interactions sociales se chiffrent en dizaines de milliards de dollars au total par an pour les États-Unis (5).

L'intérêt croissant porté à cette pathologie oculaire est illustré au travers du nombre croissant d'études rapportées sur le sujet : 128 publications par an en moyenne dans les années 90 contre 217 dans les années 2000 et 397 depuis les années 2010 (source : Pubmed). L'objectif de ces recherches est d'identifier les mécanismes de la pathologie. L'accumulation d'observations au fil des années a permis de faire évoluer la définition de la sécheresse oculaire, son diagnostic et les stratégies thérapeutiques, lors d'un comité tenu en 2007, le *Dry Eye Workshop* (DEWS). Depuis cette date, la sécheresse oculaire est définie comme : « une maladie multifactorielle des larmes et de la surface oculaire qui entraîne des symptômes d'inconfort, une perturbation visuelle et une instabilité du film lacrymal avec des lésions potentielles de la surface oculaire. Elle est accompagnée d'une augmentation de l'osmolarité du film lacrymal et d'une inflammation de la surface oculaire » (2). Malgré des avancées considérables, il reste de nombreuses inconnues dans la physiopathologie de la maladie. Or, comprendre la physiopathologie de la maladie est indispensable pour tenter de soulager efficacement les patients *via* l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'objectif de notre travail est de contribuer à la caractérisation des mécanismes sous-jacents de la sécheresse oculaire en nous focalisant sur une structure importante de cette pathologie, l'épithélium conjonctival, ainsi qu'à deux phénomènes clés : l'hyperosmolarité et l'inflammation.

Dans la première partie de ce manuscrit, nous présenterons des généralités relatives à la sécheresse oculaire en exposant des données anatomiques, les principaux facteurs de risques identifiés de la pathologie et ses diverses étiologies, son diagnostic ainsi que les traitements actuellement disponibles. Nous poursuivrons par la présentation de notre recherche bibliographique sur l'état actuel des connaissances concernant les phénomènes inflammatoires observés dans cette pathologie.

Dans la deuxième partie du manuscrit, nous présenterons les résultats expérimentaux que nous avons obtenus durant notre travail de thèse. Ils concernent l'étude de la réponse inflammatoire des cellules conjonctivales dans un modèle *in vitro* de sécheresse oculaire par hyperosmolarité saline. Dans un premier temps nous avons couplé cette étude à celle du conservateur le plus utilisé dans les formulations ophtalmiques, le chlorure de benzalkonium (BAK), identifié comme un facteur de risque de sécheresse oculaire. Puis nous avons étudié particulièrement l'induction de la chimiokine inflammatoire CCL2, et nous avons ainsi pu déterminer certaines voies cellulaires impliquées dans celle-ci. Enfin, nous avons également rapporté des résultats préliminaires comparant le comportement des cellules conjonctivales à celui des cellules monocytaires en termes d'activation d'une autre voie inflammatoire, l'inflammasome. L'ensemble de ces résultats nous a permis de déterminer que les cellules conjonctivales étaient capables de déclencher des réponses inflammatoires en réponse à une condition de stress hyperosmolaire et participaient ainsi directement à l'inflammation caractéristique de cette pathologie.

La dernière partie de ce manuscrit discutera et conclura sur les intérêts et perspectives de ces travaux, notamment en proposant de confirmer certains de ces résultats prometteurs avec des modèles *in vivo* de la pathologie, l'objectif final étant de continuer à caractériser plus profondément les mécanismes impliqués dans la sécheresse oculaire afin de trouver de nouvelles thérapies pour traiter cette maladie qui, bien loin d'être un simple "manque d'eau", est en réalité bien plus complexe et difficile à traiter.

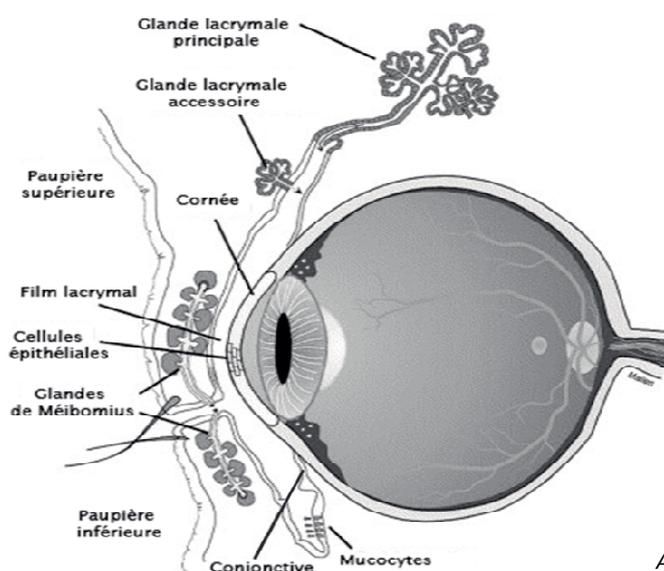
1. GÉNÉRALITÉS

1.1. RAPPELS SUR LA SÉCHERESSE OCULAIRE

La sécheresse oculaire est une pathologie très répandue, souvent sous-estimée et sous-diagnostiquée qui représente près de 25% des motifs des consultations en ophtalmologie (10). Elle est liée à une altération du film lacrymal qui met en jeu l'ensemble de l'unité fonctionnelle lacrymale (11–14). Certains facteurs de risque de la pathologie ont été identifiés et les étiologies connues peuvent être extrêmement diverses. Son diagnostic est basé sur la présence de différents signes cliniques, mais est rendu difficile par l'importante dissociation entre les signes cliniques observés et les symptômes rapportés. La thérapeutique actuelle est restreinte et consiste essentiellement en une lubrification de la surface ou à l'utilisation d'anti-inflammatoires dans les cas plus sévères.

1.1.1. Anatomie et rôles de l'unité fonctionnelle lacrymale

L'unité fonctionnelle lacrymale est constituée des paupières, des glandes lacrymales, du nerf lacrymal et de la surface oculaire (Figure 1).

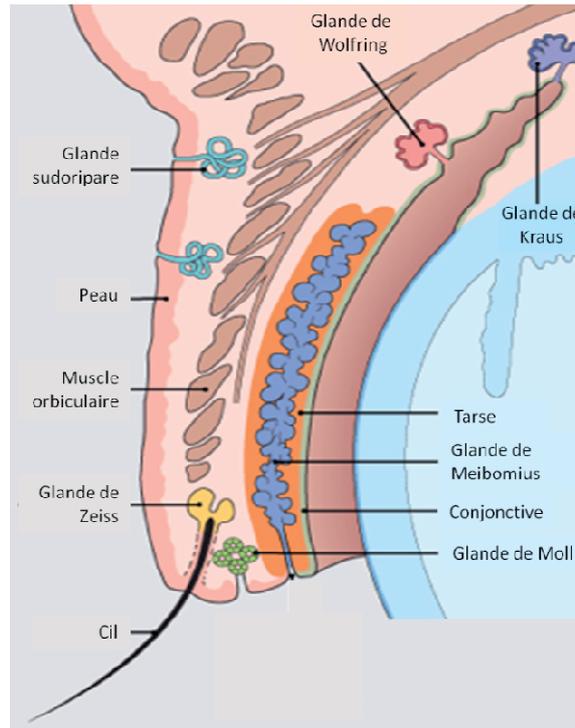


Adapté de Dartt, 2002 (15)

Figure 1. Schéma de l'unité fonctionnelle lacrymale.

1.1.1.1. Les paupières

Les paupières sont des replis musculo-membraneux qui constituent la première ligne de défense physique de la structure oculaire contre les éventuels pathogènes extérieurs. Elles participent, par leurs clignements, à la répartition homogène du film lacrymal sur la surface oculaire. Trois types de glandes sont présents sur le bord des paupières : les glandes sébacées de Meibomius, qui jouent un rôle majeur dans l'élaboration du film lacrymal *via* leur participation dans la fabrication de sa couche lipidique, et les glandes de l'appareil cilié : les glandes sudoripares de Moll et les glandes sébacées de Zeiss (Figure 2).



Adapté de <http://classconnection.com>

Figure 2. Schéma de la paupière.

1.1.1.2. Les glandes lacrymales et le nerf lacrymal

Il existe deux types de glandes lacrymales : la glande lacrymale principale et les glandes lacrymales accessoires.

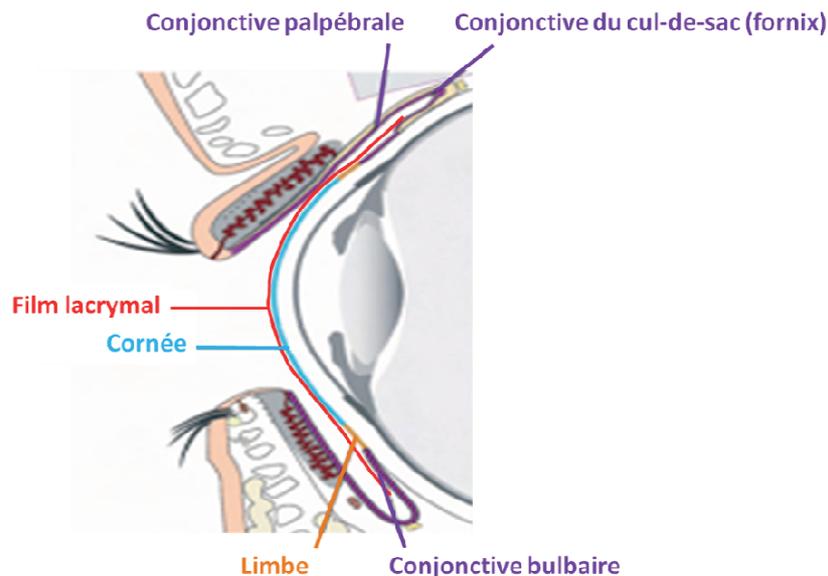
La glande lacrymale principale est une glande exocrine à structure lobulaire qui est située sous le rebord orbitaire supéro-externe de la paupière supérieure et dont les canaux excréteurs s'ouvrent dans le fond du cul-de-sac conjonctival. L'innervation de la glande lacrymale est assurée par le nerf lacrymal, correspondant au nerf ophtalmique de Willis, lui-même étant une branche du nerf trijumeau.

Les glandes accessoires sont beaucoup plus petites et de localisations variées. Parmi ces glandes, certaines sont situées au niveau de la conjonctive, ce sont les glandes à sécrétion séreuse (les glandes de Krause et les glandes de Wölfring), situées dans les culs-de-sac conjonctivaux et de structure comparable à celle de la glande lacrymale principale. Les cellules à mucus également appelées mucocytes ou cellules caliciformes, sont considérées comme des glandes lacrymales accessoires car elles participent à l'élaboration du film lacrymal *via* la production de mucus. Elles sont aussi situées dans l'épithélium conjonctival. Notons que les glandes situées dans les paupières, les glandes de Meibomius et les glandes de l'appareil cilié, sont également considérées comme des glandes lacrymales accessoires.

1.1.1.3. La surface oculaire

La surface oculaire est constituée du film lacrymal, de la conjonctive, de la cornée et du limbe, correspondant à la zone de jonction entre la cornée et la conjonctive (Figure 3).

La surface oculaire recouvre la partie la plus externe de l'œil et est ainsi en contact direct avec l'environnement extérieur. En raison de ce contact permanent avec l'environnement, elle présente une faible flore microbienne (16). Elle correspond à la deuxième structure de protection physique du globe oculaire face aux agressions et aux agents pathogènes extérieurs (bactéries, virus, champignons, parasites, polluants environnementaux). Elle représente également une défense chimique et biologique liée à la composition du film lacrymal et à la présence de cellules immunocompétentes en son sein.



Adapté de <http://3.bp.blogspot.com>

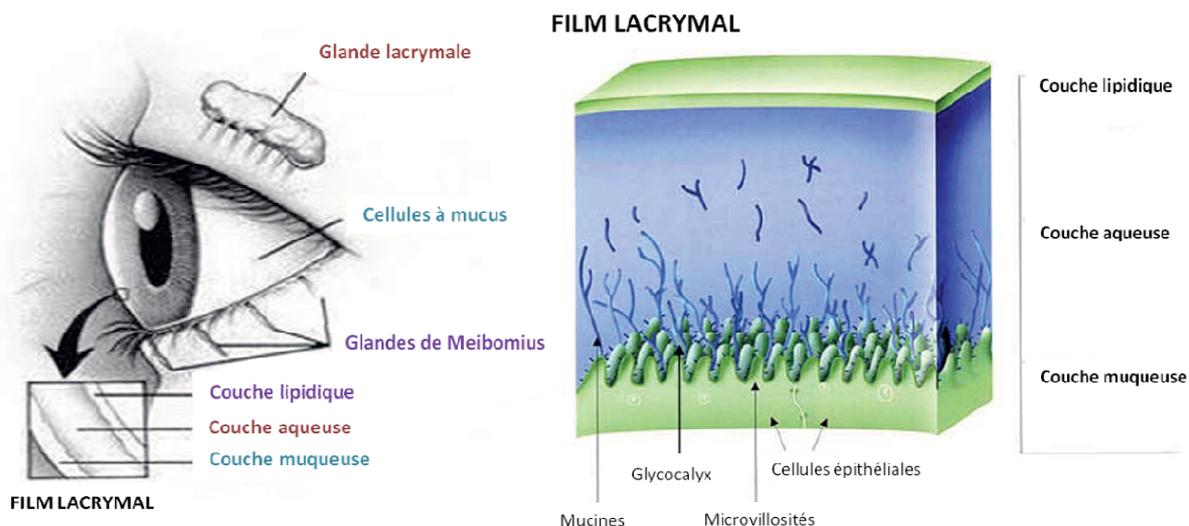
Figure 3. Schéma de la surface oculaire.

1.1.1.3.1. Le film lacrymal

1.1.1.3.1.1. Composition et rôle du film lacrymal

Le film lacrymal est l'interface entre le globe oculaire et l'environnement extérieur. Son volume total est de 7 à 9 μL , son épaisseur est estimée entre 7 à 40 μm suivant la technique utilisée pour la détecter et sa sécrétion basale est de 1 à 2 $\mu\text{L}/\text{minute}$ (17,18). Le film lacrymal a un rôle de nutrition, car il permet l'apport de nutriments et d'oxygène à la cornée qui est dénuée de vaisseaux, ainsi que de lubrifiant et de protection physique et chimique de la surface oculaire (19).

Le film lacrymal est souvent décrit comme composé de trois couches distinctes : la couche muqueuse, la couche aqueuse et la couche lipidique (de la plus profonde à la plus superficielle). En réalité, il s'apparente plus à un gel avec un gradient de concentration de mucus depuis la couche superficielle de l'épithélium, où il adhère fortement par l'intermédiaire du glycocalyx aux épithéliums cornéen et conjonctival, à la couche externe, moins concentrée en mucines solubles et recouverte par la couche lipidique qui limite l'évaporation des larmes. Le film lacrymal est dans un équilibre dynamique, chacune des composantes du film lacrymal ayant un rôle bien défini, essentiel à la physiologie de la surface oculaire (20–23) (Figure 4).



Adapté de <http://www.lea-test.fi>, <http://1.bp.blogspot.com>

Figure 4. Schéma du film lacrymal.

La couche lipidique

La couche lipidique est majoritairement produite par les glandes de Meibomius mais les glandes de Zeiss et de Moll y participent également. Le meibum excrété par ces glandes contient principalement des lipides (24–26) et également des protéines (27). Cette couche lipidique possède une structure bilamellaire : une couche profonde qui réalise l'interface avec la couche aqueuse, composée de lipides polaires, et une couche superficielle, une couche épaisse de lipides non polaires, en contact avec l'air extérieur (28,29). Elle contient des esters de cires (15 à 35%) et de stérols (8 à 34%), des triglycérides (4 à 43%), des acides gras libres (2 à 24%), des lipides polarisés (0 à 16%).

La couche lipidique a plusieurs rôles importants: elle permet de lisser le film lacrymal, optimisant ainsi les qualités optiques de la cornée, elle limite l'évaporation du film lacrymal entre deux clignements et elle améliore la stabilité et l'étalement du film lacrymal.

La couche aqueuse

La couche aqueuse est la couche la plus épaisse du film lacrymal. Elle est composée majoritairement d'eau (98%) et de mucines. Elle provient principalement des glandes lacrymales mais également d'un passage aqueux transconjonctival. La sécrétion aqueuse basale est assurée par les glandes accessoires de Krause et de Wolfring localisées dans la conjonctive. Elle permet de lubrifier la surface de l'œil et d'aider à l'élimination de la poussière. La sécrétion réflexe de larmes est assurée par la glande lacrymale principale. Elle est induite par divers stimuli (émotions, lumière vive) dont le plus classique est une irritation de l'œil due à la présence de particules. La couche aqueuse contient des mucines, des électrolytes, des facteurs de croissance parmi lesquels l'*epidermal growth factor* (EGF), des cytokines telles qu'interleukine (IL)-6 et IL-8 (30), des hormones, des immunoglobulines, des cellules épithéliales desquamées et des cellules inflammatoires (22,31,32).

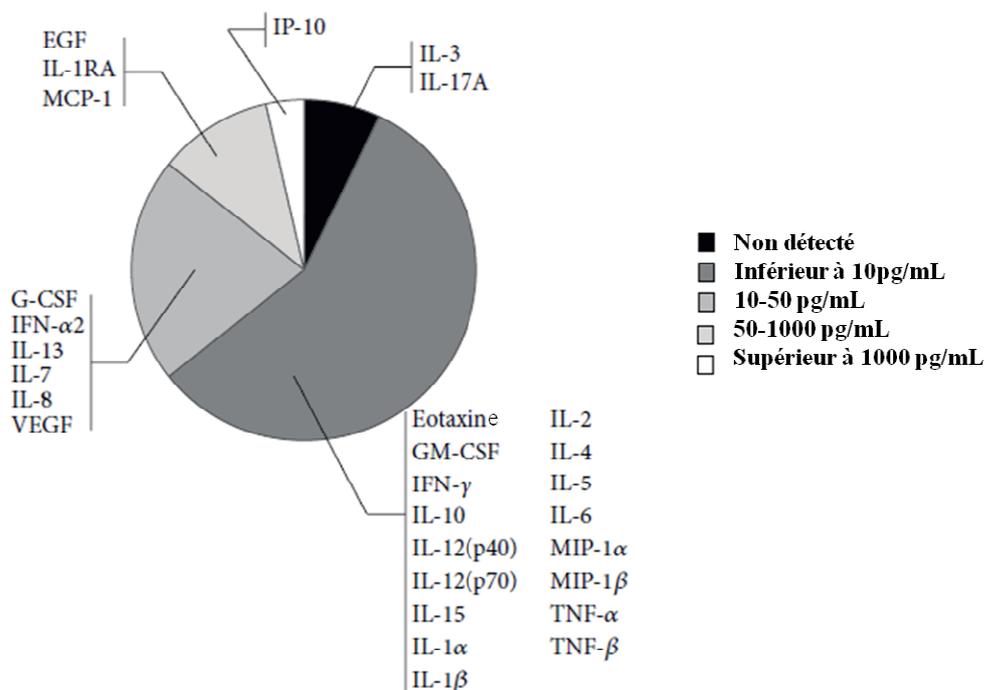
Les électrolytes proviennent des glandes lacrymale et de la conjonctive et confèrent au film lacrymal une osmolarité constante comprise entre 296 et 302 mOsm (mosm.L^{-1}) (15,33,34) (Tableau 1).

Composition ionique du film lacrymal			Composition en protéines du film lacrymal (protéines majeures)		
Na ⁺	128,7	mmol.L ⁻¹	Lysozyme	2,07	mg.mL ⁻¹
K ⁺	17		Lipocaline	1,55	
Ca ²⁺	0,32		Lactoferrine	1,65	
Mg ⁺	0,35		IgA sécrétoires	1,93	
HCO ₃ ⁻	12,4		Albumine	0,04	
Cl ⁻	141,3		IgG	0,004	

Adapté de Tiffany, 2008 (19)

Tableau 1. Composition normale du film lacrymal.

Les protéines lacrymales sont produites en quasi-totalité par les glandes lacrymales et un peu *via* une filtration depuis le secteur vasculaire. Le film lacrymal contient quatre protéines majeures : le lysozyme, la lactoferrine, la lipocaline et des IgA sécrétoires. Les lipocalines sont des protéines associées aux lipides qui forment un gel (35). La présence de nombreuses protéines anti-infectieuses telles que les immunoglobulines (Ig) IgA et IgG, le lysozyme, la lactoferrine et la β -lysine joue un rôle primordial dans la défense oculaire contre les agents microbiens (36). De nombreuses cytokines et facteurs de croissance existent dans cette phase aqueuse comme en témoigne une étude faite sur un recueil du film lacrymal dans le cul-de-sac conjonctival par l'intermédiaire d'une bandelette de Schirmer éluee ensuite dans une solution de NaCl (37) (Figure 5). Cette couche aqueuse a donc un rôle important de protection. Elle possède de plus un rôle de nutrition des couches de l'épithélium cornéen superficiel et des cellules de la surface oculaire.



In Tisato et al., 2015 (37)

Figure 5. Composition du film lacrymal en différentes cytokines
(Prélèvement de liquide lacrymal sur bandelette de Schirmer éluee ensuite en NaCl)

La couche muqueuse

La couche muqueuse est formée par un gradient de mucines solubles dont la concentration augmente avec la profondeur. Les mucines sont des glycoprotéines hydrophiles de haut poids moléculaire qui permettent l'adhérence de la couche aqueuse du film lacrymal à la surface oculaire, hydrophobe à l'origine (38). Les mucines sont le produit des gènes de la famille MUC et elles sont de deux types :

- les mucines solubles, dont MUC2 et MUC7 qui sont sécrétées par la glande lacrymale, ou les mucines formant des gels, dont la plus importante au niveau de l'œil est MUC5AC, produite par les cellules à mucus (39),
- les mucines épithéliales membranaires telles que MUC1, MUC4 et MUC16 dont une partie de la structure est ancrée dans la membrane des cellules épithéliales de la cornée ou de la conjonctive (40).

Ces mucines épithéliales forment le glycocalix et vont interagir avec les mucines solubles comme MUC5AC et ainsi stabiliser le film lacrymal. De plus, les cellules épithéliales superficielles possèdent sur leur membrane apicale des invaginations et des microvillosités permettant également de favoriser l'adhésion du film lacrymal. L'adhérence du film lacrymal aux cellules de la conjonctive et de la cornée constitue le rôle principal de cette couche mais elle aurait aussi un rôle de barrière face aux pathogènes. Notons par ailleurs que MUC7 aurait des propriétés antifongiques (41).

1.1.1.3.1.2. Régulation du film lacrymal

Les larmes sont sécrétées et résorbées en permanence. La régulation du film lacrymal dépend de trois phénomènes principaux : la sécrétion lacrymale, l'étalement correct du film lacrymal sur la surface et sa résorption, au niveau du canal lacrymo-nasal principalement et également un peu par évaporation (11).

La stimulation lacrymale est sous la dépendance d'un système neuronal périphérique en association avec le système nerveux central, ce qui permet d'intégrer des composantes émotionnelles. Les larmes sont sécrétées suite à un stimulus perçu au niveau de la surface oculaire. La régulation nerveuse induite par l'arc réflexe est médiée par une branche du nerf trijumeau va alors stimuler la glande lacrymale. Cet arc nerveux permet d'assurer une bonne lubrification de la surface ainsi qu'une réponse adaptée aux stimuli traumatiques. De plus, une régulation hormonale fine entre en jeu notamment pour modifier la qualité des larmes. Notons que certains facteurs de croissance de la famille de l'EGF auraient également un rôle dans cette sécrétion.

Par ailleurs, la sécrétion d'électrolytes, d'eau et de mucines par les cellules de la conjonctive est régulée par voie nerveuse et par des facteurs de croissance (15).

1.1.1.3.2. La conjonctive

La conjonctive est une membrane muqueuse très richement vascularisée et pluristratifiée qui recouvre la surface antérieure du globe oculaire ainsi que la face postérieure des paupières. Elle est divisée en 3 régions : la conjonctive palpébrale, la conjonctive bulbaire et les culs-de-sac

conjonctivaux, aussi appelés fornix (Figure 3). La conjonctive palpébrale recouvre les paupières et est en continuité avec le revêtement cutané. Elle est très vascularisée. Les culs-de-sac conjonctivaux correspondent à la zone de transition entre les conjonctives palpébrale et bulbaire. La conjonctive bulbaire est fine et transparente et possède deux parties : la partie sclérale qui s'étend du cul-de-sac conjonctival au limbe et la partie limbique qui forme un anneau de 3 mm de large à la jonction entre les épithéliums conjonctival et cornéen. Le limbe a un rôle nutritif envers la cornée et participe au renouvellement de l'épithélium cornéen car il contient un réservoir de cellules souches (42,43). Il a de plus des capacités de réponse inflammatoire et immunologique car il contient des lymphocytes, des cellules de Langerhans et des polynucléaires.

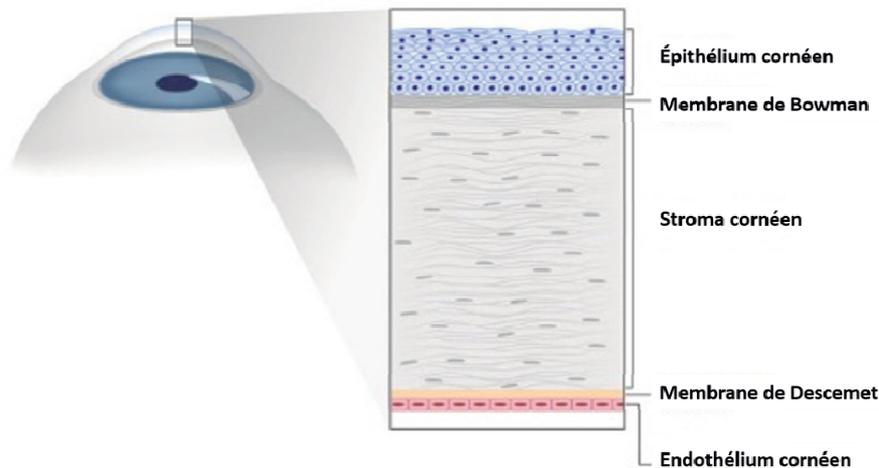
La conjonctive est constituée d'un épithélium reposant sur un chorion duquel elle est séparée par une lame basale. L'épithélium possède une couche basale et une couche superficielle, constituées de cellules épithéliales. Il s'épaissit au niveau du fornix et du limbe. Le renouvellement cellulaire s'effectue à partir des couches basales profondes indifférenciées qui possèdent un potentiel d'autorenouvellement. Les cellules ayant atteint leur stade terminal de différenciation au niveau de la couche superficielle sont progressivement éliminées dans les larmes. L'épithélium conjonctival contient, outre des cellules épithéliales, des cellules sécrétrices (les cellules à mucus) et des cellules immunocompétentes comme des cellules dendritiques, des cellules de Langerhans et des lymphocytes, majoritairement de type T (44). Au niveau basal, on observe également la présence de mélanocytes. Le chorion, ou stroma conjonctival, est un tissu conjonctif subdivisé en une couche superficielle (*lamina propria*) riche en lymphocytes et une couche profonde fibreuse présentant un maillage dense de fibres élastiques et de fibres de collagène synthétisées par des fibroblastes. Le chorion est ainsi une trame de soutien qui contient des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques et des nerfs. Des lymphocytes, des plasmocytes et des mastocytes sont également présents dans celui-ci.

La conjonctive contient plusieurs types de glandes qui participent à la sécrétion du film lacrymal : les glandes séreuses (glandes de Krause et glandes de Wölfring) et les glandes muqueuses (les glandes de Henle constituées de cellules à mucus).

La conjonctive a un rôle de protection de l'œil car elle forme une barrière physique à l'intrusion de pathogènes et elle participe aux réactions inflammatoires et immunitaires. Elle est en effet riche en cellules immunocompétentes et en cellules épithéliales qui interviennent dans les processus biologiques tels que l'inflammation (45). La conjonctive est de plus très vascularisée et très innervée ce qui en fait un site privilégié pour la réponse aux agressions. Ce tissu est considéré comme un organe lymphoïde secondaire du fait de la présence de nombreux lymphocytes dispersés dans le tissu, formant le "tissu lymphoïde associé à la conjonctive", *Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue* (CALT), responsable de la reconnaissance antigénique et allergénique (46,47).

1.1.1.3.3. La cornée

La cornée est un tissu essentiel à la vision car par suite de sa transparence, elle permet la transmission et la réflexion de la lumière. Sa face antérieure est recouverte par le film lacrymal, alors que sa face postérieure baigne dans l'humeur aqueuse de la chambre antérieure. Elle est constituée de 5 couches qui sont, de l'extérieur vers l'intérieur (Figure 6) :



Adapté de <http://www.brussels-vision-specialists.eu>

Figure 6. Les différentes couches de la cornée.

- L'épithélium cornéen : un épithélium pavimenteux, stratifié, non kératinisé, directement au contact du film lacrymal. Il est constitué de trois couches: une superficielle, une intermédiaire et une basale qui est appuyée sur la lame basale permettant le renouvellement de l'épithélium (48).
- La couche de Bowman: une composante acellulaire composée de matrice extracellulaire.
- Le stroma cornéen : une couche représentant 90% de l'épaisseur de la cornée. Il est l'élément essentiel de la stabilité de la cornée et est constitué de matrice extracellulaire, de kératocytes et de fibres nerveuses (49). Il est quasiment acellulaire, les rares kératocytes ayant pour rôle de maintenir l'intégrité de la matrice grâce à un équilibre entre synthèse et dégradation de celle-ci, *via* la synthèse de matrix métalloprotéinases (MMPs) et de composants de la matrice.
- La membrane de Descemet : une membrane correspondant à la lame basale de l'endothélium cornéen.
- L'endothélium cornéen : un tissu directement en contact avec l'humeur aqueuse de la chambre intérieure de l'œil. Il est formé d'une monocouche de cellules endothéliales reliées entre elles par des jonctions serrées et des jonctions lâches. C'est donc un endothélium perméable aux petites molécules, aux électrolytes et à l'eau. L'endothélium régule ainsi l'hydratation du stroma cornéen.

Les cellules cornéennes sont nourries principalement par la voie vasculaire du limbe. Elles sont aussi en partie nourries par les larmes pour la partie antérieure et par l'humeur aqueuse pour la partie postérieure.

La cornée est totalement dépourvue de réseau vasculaire. C'est en effet une structure qui refrène ses réactions immunitaires par un "privilège immun". Contrairement à la conjonctive, elle possède très peu de défenses immunitaires avec pour seules cellules immunocompétentes présentes, des cellules de Langerhans dans la couche basale de l'épithélium (50). Le rôle primordial de la cornée étant la vision, c'est ainsi la transparence de la cornée qui est privilégiée. Par contre, c'est le tissu le plus innervé du corps humain, une innervation purement sensitive.

1.1.2. Définition de la sécheresse oculaire

La définition de la sécheresse oculaire a fortement évolué au fil du temps en réponse aux études expérimentales qui ont enrichi les connaissances de sa physiopathologie.

En 1995, la sécheresse oculaire était définie comme un trouble du film lacrymal dû à un déficit de larmes ou à une évaporation excessive, causant des dommages de la surface oculaire, et associé à des symptômes d'inconfort oculaire (51).

Cette définition a ensuite évolué en 2007, lorsque le dernier comité de travail sur la sécheresse oculaire, le DEWS, prenant en compte les dernières avancées scientifiques et technologiques dans le domaine, a redéfini la sécheresse oculaire comme : « une maladie multifactorielle des larmes et de la surface oculaire qui entraîne des symptômes d'inconfort, une perturbation visuelle et une instabilité du film lacrymal avec des lésions potentielles de la surface oculaire. Elle est accompagnée d'une augmentation de l'osmolarité du film lacrymal et d'une inflammation de la surface oculaire » (2). Cette nouvelle définition permet d'appréhender plus facilement les mécanismes sous-jacents de cette maladie, en introduisant les notions d'atteinte tissulaire et visuelle, d'inflammation et d'hyperosmolarité, et est plus adaptée à la gravité réelle de la maladie. La sécheresse oculaire est en effet loin d'être un simple manque d'hydratation oculaire mais une pathologie beaucoup plus complexe, de forte prévalence et invalidante de plus, dont le diagnostic et le traitement sont souvent difficiles (1).

1.1.3. Épidémiologie de la sécheresse oculaire et facteurs de risque

L'épidémiologie de la sécheresse oculaire est difficile à réaliser en raison d'une symptomatologie clinique variable et du manque de corrélation entre les symptômes évoqués par les patients atteints et les résultats des tests cliniques (7,52). Cependant, les études épidémiologiques rendent ainsi compte d'une prévalence très variée suivant les populations étudiées (âge ou ethnie) et surtout les critères retenus pour définir la sécheresse oculaire (2). Globalement, ces études ont montré une prévalence variant de 5% à 35% suivant les populations étudiées (3,53,54). Ces écarts de prévalence soulignent l'importance d'adopter une définition précise de la sécheresse oculaire et d'avoir un consensus sur les examens diagnostiques de celle-ci afin d'obtenir des valeurs plus précises et robustes. Il est à noter que cette prévalence est probablement sous-estimée, car la sécheresse oculaire reste encore mal diagnostiquée, les patients ne reconnaissant pas forcément ses symptômes et ne les rapportant pas à leur médecin. Remarquons également que cette prévalence est vouée à augmenter durant les prochaines décennies en raison du vieillissement de la population.

De nombreux facteurs de risques de la sécheresse oculaire sont actuellement bien établis : l'âge avancé, avec plus de la moitié des sujets atteints ayant plus de 65 ans (55–57), le genre, les femmes étant plus touchées que les hommes, les traitements hormonaux substitutifs post-ménopause (58), une alimentation pauvre en acides gras essentiels oméga 3 (59), une carence en vitamine A (60), une chirurgie réfractive cornéenne (61–63), une greffe de moelle osseuse (réaction du greffon contre l'hôte) (64), une radiothérapie et certains médicaments, notamment les antihistaminiques mais aussi les antidépresseurs, les anticholinergiques, les bêtabloquants, les antispasmodiques, les diurétiques et l'isotrétinoïne (Ro-Accutane®). D'autres facteurs de risques sont identifiés, comme l'ethnie, les asiatiques étant plus touchés (54,65), des facteurs environnementaux comme la pollution ou les environnements ayant une faible taux d'humidité (66), le travail sur

ordinateur (67), le port de lentilles de contact (68,69), un trouble des hormones sexuelles, notamment un déficit en androgènes.

Il est important de souligner que, actuellement, il est largement admis que l'utilisation au long cours de collyres contenant un conservateur est responsable d'altérations de la surface oculaire et constitue par la même un facteur de risque de la sécheresse oculaire. En effet, le principal agent conservateur des formulations ophtalmiques, le chlorure de benzalkonium (BAK), possède des propriétés détergentes, pro-inflammatoires et cytotoxiques. Il favorise une hyperévaporation lacrymale et l'apparition de phénomènes inflammatoires qui entraînent, entretiennent et aggravent le tableau de la sécheresse oculaire (70).

Rappelons que le BAK fait partie de la famille des ammoniums quaternaires et est constitué d'un mélange de chlorures d'alkylbenzyl-diméthylammonium comportant des radicaux alkyles à nombre pair d'atomes de carbone de C8 à C18 (Figure 7).

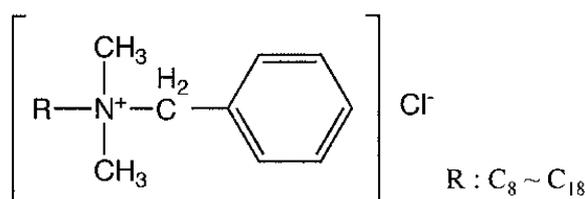


Figure 7. Formule chimique du BAK.

Le BAK est utilisé dans les formulations ophtalmiques à des concentrations allant de 0,004% à 0,025%. C'est un agent antibactérien qui agit également sur les champignons et certains virus. Il est très utilisé du fait de sa puissance bactéricide, du peu de réactions allergiques qu'il provoque et de sa bonne tolérance à l'application. Malgré ces avantages, la cytotoxicité du BAK administré par voie oculaire, à des concentrations égales à celles des collyres commercialisés, a déjà été largement démontrée, que ce soit par des études toxicologiques *in vivo* ou *in vitro*.

De nombreuses études cliniques ont permis de lui attribuer certains effets délétères tels que : une instabilité du film lacrymal et une sécheresse oculaire (71–73), une perturbation de la perméabilité de la barrière cornéenne avec diminution de la sensibilité cornéenne (74) ou une kératinisation de la conjonctive avec une diminution du nombre de cellules à mucus (75).

Les études menées sur des animaux rapportent les mêmes signes de toxicité, soit des phénomènes d'inflammation et des altérations des structures oculaires (assèchement avec instabilité du film lacrymal (76,77), dommages de la conjonctive et de la cornée) (78,79). Du fait de son effet inducteur de sécheresse oculaire, l'instillation de BAK est même actuellement utilisée comme modèle animal de sécheresse oculaire pour l'étude de la pathologie et pour tester de potentielles thérapeutiques (80,81). Des dommages liés à l'administration oculaire de BAK ont également été observés jusque dans des structures profondes de l'œil comme la rétine, avec apparition de décollement, perte d'acuité visuelle et atrophie de l'épithélium pigmentaire rétinien (82). Des phénomènes de neurotoxicité (83) et de fibrose (56) ont aussi été décrites.

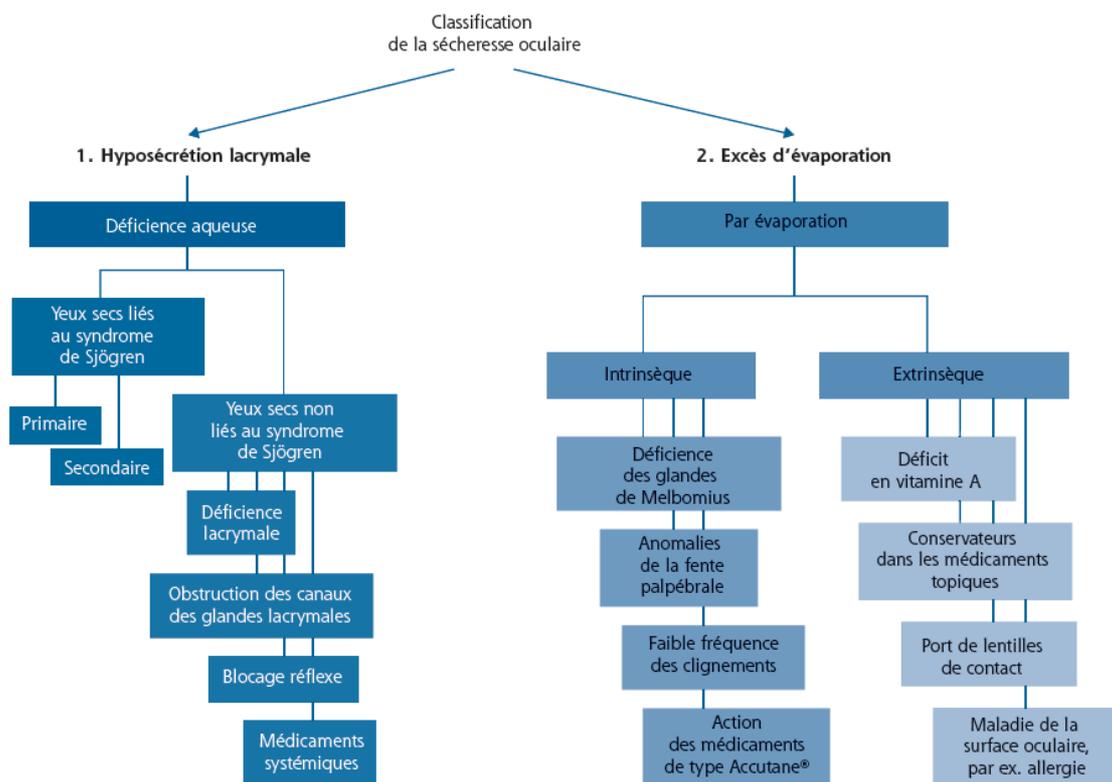
Les études menées *ex vivo* sur des empreintes conjonctivales ont, quant à elles, montré une augmentation de marqueurs d'inflammation, notamment une augmentation de l'expression de *Human Leucocyte Antigen-DR* (HLA-DR) à la surface des cellules conjonctivales de patients exposés à ce conservateur (84).

Des études *in vitro* sur des lignées cellulaires conjonctivales et cornéennes ont montré une cytotoxicité du BAK dose-dépendante, entraînant une importante mortalité cellulaire (84–86) et une augmentation de marqueurs de l'inflammation comme IL-1 et *Tumor Necrosis Factor-α* (TNF-α) (87). Le BAK induit également une augmentation de production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) et une diminution des mécanismes de défense contre le stress oxydant (88).

L'ensemble de ces données sur les effets délétères du BAK ont conduit les laboratoires pharmaceutiques à rechercher des alternatives à ce conservateur pour leurs formulations ophtalmiques, mais le BAK reste tout de même présent actuellement dans de nombreux collyres. Aussi, le BAK continue-t-il à nous intéresser particulièrement, et dans ce travail, nous avons étudié ses effets pro-inflammatoires sur les cellules conjonctivales.

1.1.4. Classification - Étiologies de la sécheresse oculaire

On distingue classiquement les sécheresses oculaires quantitatives par hyposécrétion, des sécheresses oculaires qualitatives par instabilité lacrymale. Ces dernières peuvent être liées à une hyper-évaporation ou à une anomalie de la couche muqueuse profonde. Les frontières de cette classification sont néanmoins ténues et les mécanismes souvent intriqués (Figure 8).



In Rapport de la SFO - Surface oculaire, 2015 (1), inspiré de Lemp, 1995 (51)

Figure 8. Classification des étiologies de la sécheresse oculaire.

1.1.4.1. Sécheresses oculaires par hyposécrétion

Les sécheresses oculaires par hyposécrétion peuvent être classées suivant leur étiologie dysimmunitaire ou non.

1.1.4.1.1. Pathologies dysimmunitaires

Syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS)

Le SGS est une maladie auto-immune inflammatoire chronique qui atteint le plus souvent les femmes après la ménopause. Cette pathologie cible le système glandulaire exocrine (glandes lacrymales, glandes salivaires, tube digestif, muqueuses génitales, appareil respiratoire, peau) (89). L'atteinte oculaire est présente chez 90% des patients atteints de ce syndrome. Les glandes lacrymales et salivaires des patients atteints sont infiltrées par des lymphocytes T, entraînant une mort des cellules des canaux excréteurs et des acini séreux, ce qui conduit à une hyposécrétion lacrymale avec activation d'un processus inflammatoire au niveau de la surface oculaire. Le syndrome sec lié au SGS est un des syndrome secs les plus sévères (90).

Il existe également des SGS dits "secondaires" car ils sont associés à des maladies auto-immunes spécifiques comme la polyarthrite rhumatoïde ou le lupus érythémateux disséminé.

Autres maladies dysimmunitaires

Ces maladies correspondent aux pathologies qui entraînent un dysfonctionnement des glandes lacrymales, alors que les caractéristiques d'un SGS ont été éliminées. Parmi elles se trouve la réaction du greffon contre l'hôte qui survient après une greffe de moelle et dont la sécheresse oculaire est le symptôme principal. Elle est la conséquence de la fibrose des glandes lacrymales par l'activation des lymphocytes T sur les fibroblastes, ainsi que des glandes de Meibomius, de la cornée et de la conjonctive (91).

1.1.4.1.2. Pathologies non dysimmunitaires

Déficit au niveau des glandes lacrymales

Ce déficit peut être fonctionnel ou bien lié à l'obstruction des canaux excréteurs. L'insuffisance lacrymale est le plus souvent due à l'involution des glandes lacrymales liée à l'âge et aux modifications hormonales de la ménopause et de l'andropause (92,93). C'est une des causes les plus fréquentes de sécheresse oculaire, mais le syndrome sec induit est en général d'importance minime à modérée. Elles peuvent également être liées à d'autres pathologies telles que le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) et les lymphomes.

Iatrogénie médicamenteuse

La sécheresse d'origine médicamenteuse est également fréquente mais reste souvent peu sévère. Les médicaments inducteurs de sécheresse oculaire agissent souvent *via* l'inhibition du réflexe sensitivomoteur. Parmi les plus fréquents, on trouve les antidépresseurs, les antihistaminiques, les anxiolytiques, les diurétiques et les rétinoïdes. En dehors de ces principes actifs, les conservateurs contenus dans les collyres, notamment le BAK, sont également reconnus comme étant des inducteurs de sécheresse oculaire (70).

Blocage du réflexe sensitivomoteur

Le réflexe sensitif peut être inhibé par une hypoesthésie cornéenne. Cette hypoesthésie provoque une réduction de l'arc réflexe de la surface oculaire, qui induit alors une sécheresse par réduction de la sécrétion lacrymale réflexe et de la fréquence des clignements, ce qui va augmenter l'hyperévaporation (94). Cela concerne les porteurs de lentilles de contact dont la sensibilité

cornéenne est diminuée par le port de lentilles (95). C'est également le cas de la kératite neurotrophique, une maladie dégénérative de la cornée causée par un dysfonctionnement de l'innervation trigémينية (96). Les sécheresses oculaires survenant après chirurgie réfractive sont également expliquées par des lésions au niveau des nerfs cornéens.

En outre, certaines maladies induisent une sécheresse *via* un blocage du réflexe moteur, c'est le cas de la neurofibromatose qui induit une paralysie d'une portion du nerf facial conduisant à la perte de la fonction sécrétoire motrice de la glande lacrymale.

1.1.4.2. Sécheresses oculaires par instabilité du film lacrymal

1.1.4.2.1. Causes palpébrales

Dysfonctionnement des glandes de Meibomius

Le dysfonctionnement des glandes de Meibomius est une anomalie chronique caractérisée par une obstruction des canaux terminaux et/ou des changements qualitatifs ou quantitatifs de la sécrétion glandulaire (97). C'est la cause la plus fréquente de sécheresse oculaire par hyper-évaporation. Les dysfonctionnements peuvent être liés à un déficit sécrétoire, avec hyperkératinisation du conduit principal de la glande évoluant vers une atrophie progressive (98), ou une hypersécrétion, secondaires aux pathologies dermatologiques telles que la rosacée. La couche lipidique résultante est alors altérée, incapable de maintenir la stabilité du film lacrymal et de lutter contre l'évaporation de la couche aqueuse.

Les causes de dysfonctionnements meibomiens sont multiples, parmi elles, le port de lentilles de contact, la chirurgie réfractive, les traitements hormonaux substitutifs ou la colonisation par *Demodex folliculorum*.

Trouble de la statique ou de la dynamique palpébrale

Toute anomalie de la statique palpébrale (malpositions palpébrales, exophtalmie...) va altérer la répartition correcte du film lacrymal et provoquer une hyperévaporation localisée ou globale (99). Par ailleurs, une faible fréquence de clignement des paupières va augmenter le temps d'exposition à l'air et ainsi induire une évaporation accrue du film lacrymal. Une diminution de la fréquence peut être observée dans différentes pathologies notamment la maladie de Parkinson. Une sécheresse oculaire peut également apparaître chez des individus dont la profession implique une concentration et une fixation soutenue sur un écran informatique, ce qui conduit à une diminution de la fréquence des clignements (100).

1.1.4.2.2. Causes extrinsèques

La vitamine A est essentielle au développement des cellules à mucus et à l'expression des mucines du glycocalyx. Un déficit en vitamine A conduit ainsi à un film lacrymal très instable. Il induit également une sécheresse par hyposécrétion car conduit à des acini lacrymaux endommagés.

Les troubles hormonaux, notamment ceux touchant les hormones sexuelles, et également ceux touchant les hormones thyroïdiennes, peuvent eux aussi avoir un rôle dans les sécheresses oculaires *via* leur action sur les glandes de Meibomius, la sécrétion lacrymale et la densité des cellules à mucus (101).

Les allergies présentent également souvent des symptômes oculaires, la moitié des patients ayant une conjonctivite allergique présentant une sécheresse oculaire (102).

La sécheresse oculaire par instabilité lacrymale peut également être induite par certains collyres, les collyres anesthésiants par exemple, qui réduisent la fréquence des mouvements palpébraux. Les conservateurs de collyre peuvent être responsables d'une instabilité du film lacrymal pouvant conduire à une sécheresse. Le port des lentilles de contact induit une sécheresse oculaire *via* ce même mécanisme d'instabilité, car la couche lipidique est modifiée dans sa composition et son aspect par la présence des lentilles de contact (69). Enfin, la plupart des pathologies de la cornée entraînent une déstabilisation du film lacrymal qui induit une sécheresse oculaire.

1.1.5. Diagnostic de la sécheresse oculaire

Le diagnostic de sécheresse oculaire se fait à l'aide d'un interrogatoire du patient et d'un examen clinique, complétés par un examen de la surface oculaire et du film lacrymal. Ces différents examens vont permettre d'identifier l'étiologie de la sécheresse et de déterminer la sévérité de la pathologie afin d'adapter au mieux le traitement.

1.1.5.1. Interrogatoire

L'interrogatoire du patient permet de définir le terrain (l'âge, le sexe), les antécédents médicaux (allergies, maladies auto-immunes...), chirurgicaux (chirurgie réfractive notamment) et familiaux ainsi que les traitements médicamenteux antérieurs et actuels. Il permet également de renseigner sur l'histoire de la maladie (délai d'apparition de la maladie, intensité et évolution) et la recherche de symptômes.

Le recueil des symptômes permet un diagnostic de sévérité fonctionnelle plus qu'un véritable diagnostic. En effet, les symptômes induits par la sécheresse oculaire sont non spécifiques : les symptômes rapportés par les patients sont des sensations d'inconfort oculaire, des picotements, des sensations de brûlure, des douleurs oculaires, une photophobie ou un prurit. Certains signes sont un peu plus spécifiques comme un larmoiement exagéré (au vent, au froid...), appelé larmoiement paradoxal, ainsi que l'augmentation des symptômes en fin de journée et la nuit. Déterminer l'éventuelle périodicité des symptômes, les facteurs déclenchants et les facteurs aggravants est également important pour caractériser la pathologie.

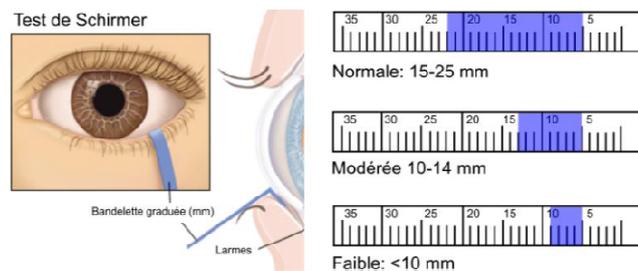
L'ensemble de ces informations va permettre de déterminer l'étiologie de la sécheresse et d'adapter au mieux la prise en charge. Différents questionnaires spécifiques de la sécheresse oculaire sont largement utilisés, c'est le cas de l'*Ocular Surface Disease Index* (OSDI) ou du *Dry Eye Questionnaire* (DEQ) qui vont permettre notamment de déterminer le retentissement des symptômes sur la vie quotidienne du patient (103). Ils sont utilisés pour compléter le diagnostic, identifier la sévérité de la pathologie et éventuellement apprécier les effets d'un traitement. Le questionnaire OSDI présente 3 parties : la première concerne la présence ou non de symptômes oculaires et leur fréquence, la deuxième identifie les éventuelles difficultés à effectuer des activités quotidiennes, la troisième analyse l'inconfort oculaire lié à certaines conditions environnementales (Annexe). Ce questionnaire permet d'obtenir un score entre 0 et 100 permettant alors de classer l'éventuelle sécheresse oculaire en différents stades : léger, modéré ou sévère.

1.1.5.2. Examen clinique et examen de la surface oculaire

Le diagnostic de sécheresse oculaire étant difficile à établir uniquement avec les symptômes, un examen clinique est indispensable (104). Celui-ci comprend un examen du visage et des paupières, de la cornée, du limbe et de la conjonctive. L'état de la surface oculaire et du film lacrymal va ensuite être déterminé par plusieurs tests effectués en routine.

1.1.5.2.1. Examen clinique de l'unité fonctionnelle lacrymale

L'évaluation de la sécrétion lacrymale est effectuée en ayant recours au test de Schirmer, lequel est réalisé avec une bandelette qui se colore au contact des larmes et dont une extrémité est placée repliée dans la paupière inférieure du patient. Le liquide lacrymal va alors remonter le long de la bandelette par capillarité (Figure 9). La sécrétion sera donc estimée en fonction de la longueur colorée à la fin du test qui dure 5 min. En fonction du résultat, la sécrétion sera alors qualifiée de normale, modérée ou faible. Notons qu'il faut éviter le contact avec la cornée, qui déclencherait une sécrétion lacrymale réflexe faussant le résultat.



Adapté de <http://www.mausmarrow.com>

Figure 9. Test de Schirmer.

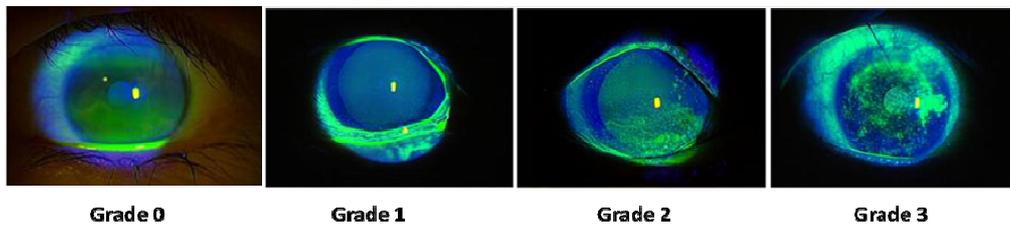
La **stabilité du film lacrymal**, ainsi que sa qualité, est appréciée par le temps de rupture du film lacrymal (*Tear Break up time*, TBUT) (105,106). Après instillation d'une quantité minimale de fluorescéine, le délai d'apparition de la rupture du film lacrymal, soit l'intervalle de temps qui sépare le dernier clignement de la première « rupture » du film lacrymal détectée en utilisant la lampe à fente, est mesuré. Les valeurs normales sont supérieures à 15 secondes, la valeur en deçà de laquelle le temps de rupture est considéré comme pathologique est de 8 secondes, la règle étant d'effectuer une moyenne de 2 ou 3 mesures (107).

L'**intégrité de la surface oculaire** est étudiée *via* des tests utilisant le dépôt d'une goutte de colorant sur la surface qui permet alors de mettre en évidence les altérations et les irrégularités de la cornée et de la conjonctive (108).

Deux colorants peuvent être utilisés : la fluorescéine et le vert de lissamine.

La fluorescéine est un colorant fluorescent qui permet d'objectiver les pertes cellulaires épithéliales. Elle ne colore ni le mucus, ni les cellules elles-mêmes (109). Une imprégnation à la fluorescéine intervient lorsque les jonctions intercellulaires sont rompues. Ce marquage est détectable par examen à la lampe à fente et quantifié en utilisant une échelle de 0 à 4 : 0 correspond à une absence de marquage signant l'intégrité de la surface oculaire, 4 correspond à un marquage fort, signant une altération très importante de l'épithélium de la surface oculaire (Figure 10).

Schématiquement, les lésions sont conjonctivales lors de sécheresses oculaires modérées alors qu'elles atteignent la cornée dans les formes sévères.



Adapté de Ogawa et al., 2013 (110)

Figure 10. Test à la fluorescéine.

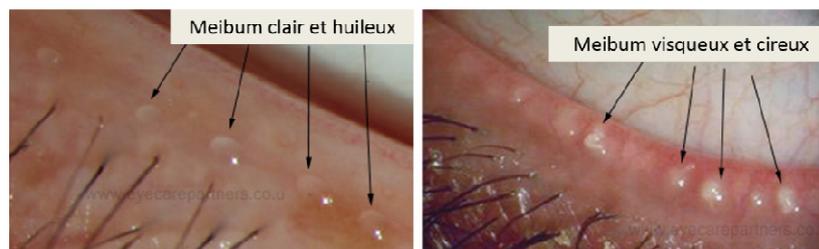
Le vert de lissamine colore uniquement les cellules mortes et permet d'apprécier la souffrance des cellules épithéliales de la surface (Figure 11).



In Cruzot-Garcher, 1999 (109)

Figure 11. Test au vert de lissamine chez un patient souffrant d'une sécheresse oculaire présentant une altération importante de l'épithélium conjonctival.

Ces examens peuvent également être complétés par un **examen des glandes de Meibomius** *via* une expression forcée du meibum (meibopression). Une pression sur la face antérieure des paupières, près du bord libre, fait apparaître le meibum au niveau des méats meibomiens. Un meibum normal est transparent et huileux et sort facilement. Un meibum pathologique sort difficilement et prend un aspect visqueux (Figure 12).



Adapté de <http://www.eyecarepartners.co.uk>

Figure 12. Test de meibopression chez un individu sain et un individu présentant un dysfonctionnement meibomien.

1.1.5.2.2. Examen biologique de l'unité fonctionnelle lacrymale

L'examen biologique des larmes et des cellules conjonctivales complètent l'examen clinique du patient.

1.1.5.2.2.1. Analyse des larmes

La mesure de l'**osmolarité lacrymale** est considérée comme un *gold standard* du diagnostic de la sécheresse oculaire puisqu'elle est moins sujette à variabilité que les autres signes classiques de la sécheresse oculaire (2,111–114). Les valeurs normales sont d'environ 300 mOsM, la valeur seuil établie pour évoquer une sécheresse oculaire est de 316 mOsM (115). C'est un marqueur relativement spécifique et sensible de la sécheresse mais qui doit être interprété en fonction de l'interrogatoire et de l'examen clinique. En effet, il existe des chevauchements entre les valeurs d'osmolarité lacrymale d'individus sains et de patients atteints de sécheresse oculaire (116). D'après des études récentes, plus qu'une valeur seuil, il semble que la valeur la plus élevée d'osmolarité obtenue après plusieurs dosages ainsi que la différence entre deux mesures soient un critère plus fiable, car meilleur témoin de l'instabilité lacrymale (117). La mesure de l'osmolarité s'effectue grâce à un appareil, le « Tear Lab™ », couramment utilisé en clinique. Il consiste en un stylo dont il faut placer l'embout au contact de la fine couche lacrymale se trouvant entre la paupière inférieure et l'œil (Figure 13). Ce test est bien toléré par le patient, il est indolore et le résultat est obtenu très rapidement.



Adapté de <http://www.tearlab.com>

Figure 13. Dosage de l'osmolarité lacrymale et appareil TearLab™.

Des examens biologiques peuvent également être effectués sur le liquide lacrymal et nécessitent alors son prélèvement (Figure 14). Celui-ci peut s'avérer extrêmement difficile, en particulier dans les cas de sécheresse oculaire. Dans certains cas sévères de sécheresse, il s'avère même impossible.



In Rapport de la SFO - Surface oculaire, 2015 (1)

Figure 14. Prélèvement de larmes à la pipette de transfert.

L'analyse des larmes s'avère pourtant très intéressante mais elle est soumise à controverse du fait de la sécrétion lacrymale réflexe qui peut être stimulée par le dispositif de recueil et ainsi fausser les résultats par dilution. Notons que certains de ces examens nécessitent d'avoir un laboratoire spécialisé dans le recueil des larmes et dans les techniques biologiques qui peuvent être appliquées à de petites quantités de produit biologique et que, en cela, l'exploration biologique du film lacrymal est parfois limitée.

La **composition protéique des larmes** peut être étudiée par électrophorèse qui va permettre de séparer les protéines du film lacrymal. Ces techniques se concentrent sur la détection des protéines majeures du film lacrymal : les lipocalines, l'albumine, les IgA sécrétoires, les immunoglobulines totales, la lactoferrine et le lysozyme. Dans des cas de sécheresse oculaire liée à la glande lacrymale, certains des pics de protéines détectés peuvent être diminués selon la sévérité de la maladie. Cette technique permet également de déceler des processus inflammatoires *via* l'augmentation des taux de protéines totales, d'albumine et d'immunoglobulines.

Le **dosage spécifique des protéines lacrymales** majeures, le lysozyme et la lactoferrine, peut également être réalisé et renseigne sur l'activité métabolique de la glande lacrymale car elles sont synthétisées par celle-ci. Une diminution de leur concentration est donc un indicateur d'un dysfonctionnement de cette glande (118). Les méthodes de dosages standards peuvent être utilisées notamment la technique *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA). Des kits commerciaux ont été développés pour simplifier ces dosages et les rendre accessibles aux cliniciens pour une analyse semi-quantitative.

1.1.5.2.2. Analyse des empreintes conjonctivales

L'étude des différents composants des larmes étant confrontée à certains écueils dont un très faible volume dans certains cas sévères et le risque d'une stimulation entraînant un larmoiement diluant les composants à doser, une technique a alors émergé, celle des **empreintes conjonctivales**. Cette technique permet le recueil de la couche cellulaire superficielle de l'épithélium conjonctival (119,120), de façon très peu invasive, rapide et quasiment indolore. Elle consiste en l'application d'un papier filtre sur la conjonctive bulbaire supérieure (Figure 15).



In Rapport de la SFO - Surface oculaire, 2015 (1)

Figure 15. Technique classique de prélèvement d'empreinte conjonctivale.

Elle peut ensuite être soumise à un examen cytologique permettant de visualiser: la densité cellulaire des cellules épithéliales et des cellules à mucus, les signes de souffrance cellulaire ainsi que la présence de cellules inflammatoires et parfois d'une métaplasie squameuse. Il peut également être fait une analyse immunocytochimique par cytométrie en flux sur les empreintes conjonctivales. Elle permet d'analyser des marqueurs biologiques d'inflammation, dont le principal est HLA-DR, actuellement considéré comme le meilleur marqueur d'inflammation au niveau de la surface oculaire, ce qui en fait un marqueur très important de la sécheresse oculaire (45,121–123). Cette technique apporte de nombreux renseignements, cependant elle reste peu réalisée en routine et est surtout utilisée en recherche pour étudier la physiopathologie de la sécheresse oculaire.

Notons que la **recherche d'un SGS** est effectuée en procédant à deux examens complémentaires : la recherche d'auto-anticorps circulants spécifiques de la maladie et la biopsie des glandes salivaires accessoires qui révèle une fibrose et une infiltration de cellules mononucléées.

1.1.5.3. Examens d'imagerie et examens fonctionnels

L'état du film lacrymal peut également être évalué *via* l'étude du film lipidique par interférométrie (124). Cette technique permet d'évaluer la répartition et l'épaisseur du film lipidique ainsi que la stabilité du film lacrymal. Il est aussi possible de mesurer le taux d'évaporation des larmes par évaporimétrie *via* un système sophistiqué de lunettes fermées avec des capteurs (125). Enfin, le volume lacrymal peut être analysé par méniscométrie. Ces différentes techniques sont cependant plutôt utilisées en recherche clinique qu'en routine.

L'analyse du meibum et des glandes de Meibomius peut se faire par meibométrie, ce qui permet d'estimer la quantité de sécrétion meibomienne. La composition en lipides meibomiens peut quant à elle être analysée par chromatographie.

La surface oculaire peut être également étudiée par microscopie confocale *in vivo*, *via* le HRT (*Heidelberg Retina Tomograph*). Cette technique permet de visualiser *in situ* les altérations morphologiques de la surface oculaire et de repérer facilement la souffrance des cellules épithéliales de la conjonctive et de la cornée (126), des cellules à mucus ainsi que les phénomènes inflammatoires. C'est une technique très répandue dans les grands centres ophtalmologiques.

L'interprétation de l'ensemble de ces examens doit être globale, chaque résultat constituant un argument supplémentaire mais qui est insuffisant si pris isolément. En effet, la variabilité de ces examens est importante d'une consultation à l'autre et leur sévérité est mal corrélée aux symptômes rapportés par les patients (127). Ces examens couplés à l'interrogatoire du patient vont permettre d'évaluer la sévérité de la sécheresse oculaire (128) et d'orienter le médecin vers la thérapeutique adaptée (Tableau 2).

Niveau de sévérité de la sécheresse oculaire	1	2	3	4
Sévérité et fréquence de l'inconfort	Minime et/ou épisodique Survient en cas de stress environnemental	Modéré épisodique ou chronique, avec ou sans stress	Sévère, fréquent ou constant sans stress	Sévère et/ou handicapant et constant
Symptômes visuels	Aucun ou épisodique minime Fatigue	Gênant et/ou limitation d'activité épisodique	Gênant, chronique et/ou limitation d'activité constante	Constant et/ou handicapant
Hyperhémie conjonctivale	Aucune à minime	Aucune à modérée	±	+ / ++
Coloration conjonctivale	Aucune à minime	Variable	Modérée à marquée	Marquée
Coloration cornéenne (sévérité, localisation)	Aucune à minime	Variable	Marquée centrale	Érosion punctiforme sévère
Signes cornéens/lacrymaux	Aucun à minime	Débris minimes, baisse du ménisque	Kératite filamenteuse, dépôts de mucus, augmentations des débris lacrymaux	Kératite filamenteuse, dépôts de mucus, augmentations des débris lacrymaux, ulcération
Paupières/glandes de Meibomius	Dysfonction des glandes de Meibomius variablement présente	Dysfonction des glandes de Meibomius variablement présente	Dysfonction des glandes de Meibomius fréquente	Trichiasis, kératinisation, symblépharon
<i>Tear break-up time</i> (secondes)	Variable	≤ 10	≤ 5	Immédiat
Test de Schirmer (mm/5 min)	Variable	≤ 10	≤ 5	≤ 2

In Rapport de la SFO - Surface oculaire, 2015 (1) inspiré de Behrens et al, 2006 (128)

Tableau 2. Classification de la sévérité de la sécheresse oculaire.

1.1.6. Traitement de la sécheresse oculaire

Le traitement de la sécheresse oculaire est complexe en raison de mécanismes sous-jacents multiples et de la fréquente discordance observée entre les signes cliniques et les symptômes. Il n'existe actuellement aucun traitement idéal et la stratégie thérapeutique débute avec de simples instillations de substituts lacrymaux. Si ceux-ci ne sont pas suffisants pour traiter les symptômes, il peut être prescrit des collyres anti-inflammatoires ou un collyre de sérum autologue. Dans certains cas, des moyens mécaniques de rétention lacrymale peuvent également être mis en place en parallèle (129). Les cas de sécheresse par insuffisance meibomienne nécessitent de plus des mesures d'hygiène palpébrale.

L'ensemble de ces stratégies thérapeutiques est accompagné de mesures environnementales et comportementales. Des compléments alimentaires en oméga 3 (130,131) peuvent également être proposés. Dans certains cas où la maladie, *via* son caractère invalidant et chronique, agit sur le psychisme des patients, une prise en charge psychologique peut être nécessaire.

1.1.6.1. Les substituts lacrymaux

Les substituts lacrymaux sont le traitement de première intention de la sécheresse oculaire. Ils ont pour objectif d'augmenter le volume lacrymal, d'humidifier et lubrifier la surface cornéo-conjonctivale, de stabiliser le film lacrymal et/ou de diminuer l'osmolarité lacrymale. Il existe un panel très vaste de substituts lacrymaux qui se différencient par la nature et la concentration des agents pharmacologiques qu'ils contiennent. Ils se différencient aussi par leur présentation : multidoses ou unidoses, avec ou sans conservateur.

On distingue les larmes artificielles simples, comme les solutions salines physiologiques (Larmabak®), les polymères de vinyle tels que la povidone (Dulcilarmes®), les dérivés cellulose, tels l'hypromellose ou la carbomellose (Celluvisc®) (132), les carbomères, le hyaluronate de sodium (Visméd®) (133) ou les hydroxypropyl-guar.

Les substituts lacrymaux sont d'autant plus rémanents qu'ils ont une viscosité élevée mais cependant engendrent alors parfois des troubles visuels après l'instillation. Les propriétés recherchées de ces agents pharmacologiques sont : une forte viscosité, une rémanence importante, un pouvoir de rétention d'eau élevé et un pouvoir abaisseur de tension de surface de l'eau. Certains de ces substituts sont également formulés de façon à être hypo-osmolaires, ceci afin de contrecarrer l'hyperosmolarité lacrymale présente dans la pathologie.

Actuellement, des substituts lacrymaux « améliorés » se développent tels que ceux contenant un osmorégulateur, soit un osmolyte compatible. Les osmolytes compatibles, tréhalose ou levo-carnitine par exemple, sont des composés qui ont pour propriété de s'accumuler dans les cellules en cas de stress hyperosmolaire et permettent alors d'équilibrer le gradient osmotique de part et d'autre de la membrane cellulaire tout en ne nuisant pas à ses fonctions physiologiques (134). Ces collyres ne sont pas encore disponibles en France. C'est également le cas des collyres sécrétagogues qui ont la propriété de stimuler la sécrétion aqueuse et /ou muqueuse, comme le diquafosol et le rebapimide (135).

Il existe également des émulsions lipidiques qui sont plutôt indiquées dans les insuffisances meibomiennes (Cationorm®).

1.1.6.2. Les moyens mécaniques de rétention lacrymale

Des moyens mécaniques peuvent être ajoutés à un traitement par substitut lacrymal qui ne serait pas suffisamment efficace. C'est le cas de l'occlusion des points lacrymaux, transitoire ou définitive, réalisée *via* des bouchons/clous méatiques ou par chirurgie, qui ont pour but de retenir le peu de larmes présentes (136–138).

L'utilisation de lunettes à chambre humide peut également être proposée. Il s'agit de lunettes fermées limitant l'évaporation lacrymale et maintenant un niveau d'humidité élevée au niveau péri-oculaire.

Il existe également des verres scléreaux spécifiquement développés pour maintenir un film aqueux précornéen et permettre également une amélioration de l'acuité visuelle (139).

Enfin, il existe aussi des inserts celluloseux que l'on place dans le fornix et qui libèrent durant 12 à 24 heures des dérivés de cellulose, lesquels augmentent la stabilité lacrymale ce qui évite des instillations répétées de substituts lacrymaux (140).

1.1.6.3. Le collyre de sérum autologue

Le collyre de sérum autologue est un des traitements majeurs de la sécheresse oculaire sévère. Il est fabriqué à partir d'un prélèvement sanguin du patient dans les pharmacies hospitalières habilitées, qui sont peu nombreuses en France. Après isolement du sérum, celui-ci est dilué au 1/5 dans une solution saline physiologique et conditionné en flacons nominatifs.

Le sérum autologue améliore l'état de la surface oculaire en souffrance *via* l'apport de facteurs de croissance, de fibronectine, de vitamines, d'immunoglobulines aux cellules de la cornée et de la conjonctive. Il agit notamment en favorisant la cicatrisation cornéenne (141–143). Les études cliniques rapportent, entre autres, une régression des symptômes, une amélioration de l'état de la surface oculaire avec augmentation de la densité des cellules à mucus (144).

L'inconvénient de cette thérapie est dû à sa principale complication, l'infection, à laquelle s'ajoutent des contraintes "logistiques" imposées aux patients consistant en des déplacements très réguliers à la pharmacie hospitalière en raison de la conservation délicate de cette préparation.

1.1.6.4. Thérapeutiques anti-inflammatoires locale et orale

La thérapeutique anti-inflammatoire est un des piliers du traitement de la sécheresse oculaire non soulagée par les substituts lacrymaux. Son but est de briser le cercle vicieux d'entretien de la pathologie au niveau de la surface oculaire, en diminuant localement les phénomènes inflammatoires. L'inflammation est en effet un des mécanismes majeurs impliqués dans la sécheresse oculaire.

C'est la raison pour laquelle un certain nombre de molécules ayant des propriétés anti-inflammatoires ont été essayées. Aussi, verrons-nous dans le second chapitre les différents traitements, avec leurs mécanismes et leurs particularités, qui sont actuellement proposés.

1.2. HYPEROSMOLARITÉ ET INFLAMMATION, AU CŒUR DE LA SÉCHERESSE OCULAIRE

La définition de la sécheresse oculaire révisée en 2007 par le DEWS souligne l'importance de deux phénomènes ayant lieu au niveau de la surface de l'œil : l'hyperosmolarité lacrymale et l'inflammation. Ces deux phénomènes sont considérés comme les mécanismes clés de cette pathologie qui participent à l'entretien de la maladie. L'objectif de nos travaux est de caractériser la réaction des cellules conjonctivales dans un modèle de sécheresse *in vitro*, c'est-à-dire au contact d'un milieu hyperosmolaire, plus particulièrement en termes d'inflammation, et d'identifier certains mécanismes sous-jacents encore peu connus de la pathologie.

Après une description des différents effets connus de l'hyperosmolarité sur la cellule et la cascade d'événements intracellulaires qu'elle entraîne, nous allons présenter les différentes données cliniques et expérimentales actuellement disponibles qui ont permis d'identifier l'importance de la composante inflammatoire de la sécheresse oculaire. Dans ce chapitre, nous décriront également les effets bénéfiques rapportés des traitements anti-inflammatoires sur la pathologie, confirmant ainsi l'importance de l'inflammation dans la pathophysiologie de cette maladie (145). Le rôle majeur de l'hyperosmolarité dans la pathologie, et notamment sa responsabilité dans le développement de phénomènes inflammatoires, est démontré par les résultats des différentes études utilisant des modèles expérimentaux hyperosmolaires de sécheresse oculaire. C'est l'ensemble de ces données qui a conduit à repenser complètement l'approche de cette pathologie en plaçant l'instabilité lacrymale au cœur d'un cercle vicieux auto-entretenu dans lequel l'hyperosmolarité et l'inflammation occupent des rôles majeurs. Ce chapitre décrivant l'état de l'art concernant les liens entre sécheresse oculaire, inflammation et hyperosmolarité doit faire l'objet d'une revue proposée au Journal Français d'Ophtalmologie.

1.2.1. Effets intracellulaires induits par l'hyperosmolarité

Les phénomènes intracellulaires engendrés par le stress hyperosmolaire sur les cellules sont en partie identifiés, ceci grâce aux études cellulaires *in vitro*. Ces études ont été menées en particulier sur les cellules rénales car, ayant un rôle dans la concentration de l'urine, elles sont physiologiquement soumises à ce type de conditions (146,147). Ce type de stress va déclencher dans la cellule une cascade d'événements intracellulaires qui va permettre à celle-ci de s'adapter à ces conditions particulières et d'y survivre (Figure 16).

Un des premiers événements survenant lors d'un stress hyperosmolaire est la diminution quasi instantanée du volume cellulaire dans les secondes ou minutes suivant le stress, conduisant à une augmentation de la concentration de l'ensemble des composants intracellulaires dont les électrolytes (148). Cette concentration en ions minéraux va permettre d'équilibrer l'osmolarité de part et d'autre de la membrane cellulaire (134). L'augmentation intracellulaire de ces ions peut à terme conduire à des effets délétères sur les fonctions cellulaires, jusqu'à provoquer la mort cellulaire, ce qui fait qu'ils sont parfois appelés osmolytes "perturbants" (149–151).

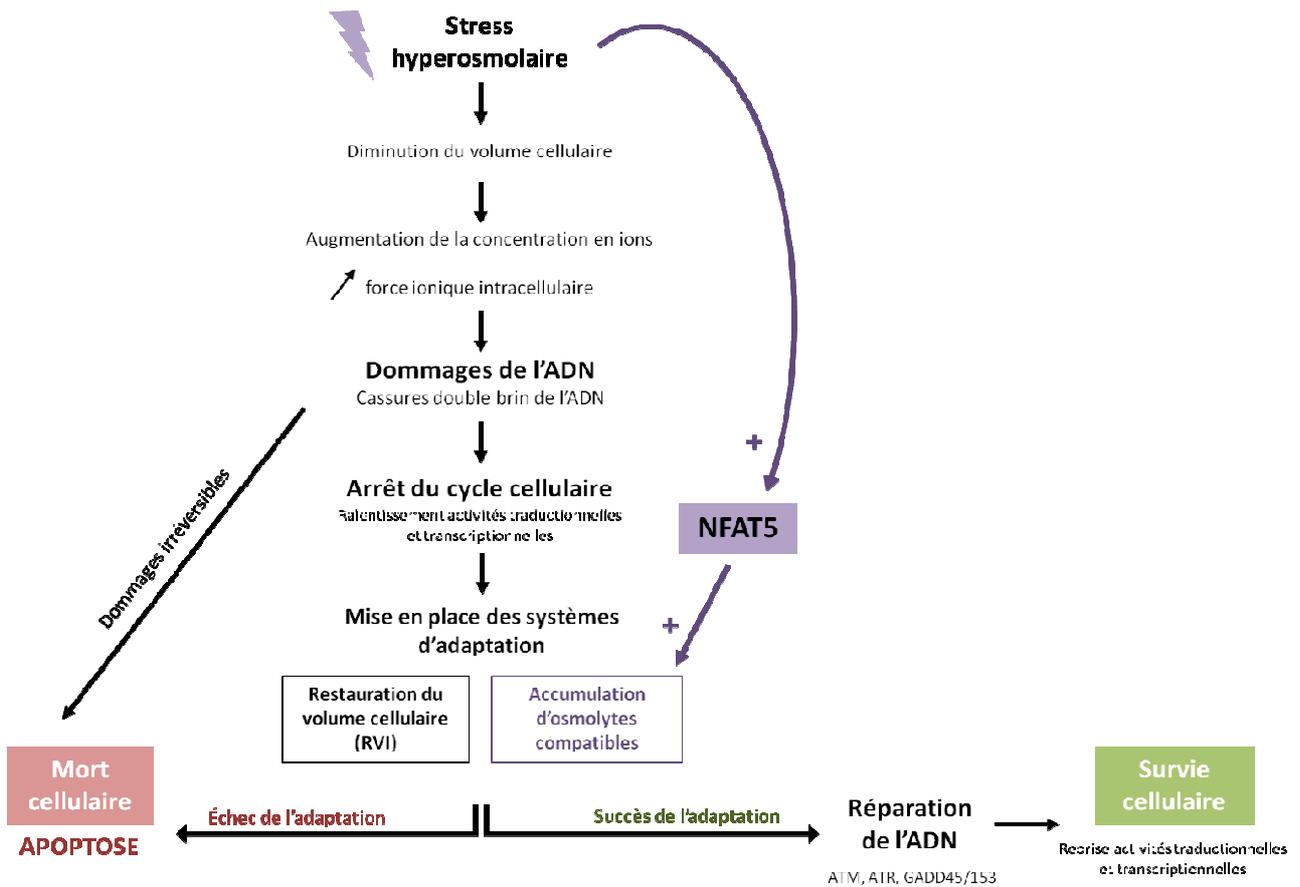
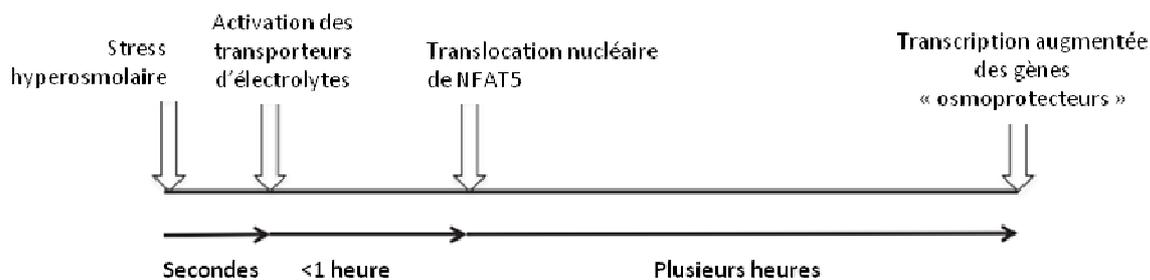


Figure 16. Effets intracellulaires de l'hyperosmolarité.

Les dommages à l'ADN apparaissent ensuite rapidement et sont en partie liés à l'augmentation de la force ionique cellulaire. Ils sont couplés à une diminution des activités transcriptionnelles et traductionnelles ainsi qu'au ralentissement ou à l'arrêt du cycle cellulaire (152). Les phénomènes compensatoires et d'adaptation se mettent alors en place, *via* le phénomène de *Regulatory Volume Increase* (RVI) qui permet la restauration du volume cellulaire couplée à l'entrée d'ions dans les cellules. La concentration en ions minéraux va ainsi rester élevée. Ces osmolytes "perturbants" vont ensuite être remplacés au fur et à mesure par des osmolytes organiques dits osmolytes "compatibles". Ces osmolytes, tout en maintenant une osmolarité intracellulaire élevée, ne perturbent pas le fonctionnement et la structure macromoléculaire de la cellule et ne modifient pas les protéines cellulaires, et ce même à des concentrations très élevées (153,154).

Ces phénomènes compensatoires sont médiés par des modulations de l'expression génique des cellules, notamment *via* le facteur de transcription *Nuclear Factor of the Activated T cells-5* (NFAT5) qui induit la transcription de gènes dits "osmoprotecteurs" (Figure 17). Une fois le volume cellulaire restauré et les phénomènes d'adaptation mis en place, la cellule peut reprendre ses activités transcriptionnelles et traductionnelles et proliférer.



In Cheung et al., 2006 (155)

Figure 17. Délai d'activation des différents mécanismes intracellulaires mis en place lors d'un stress hyperosmolaire.

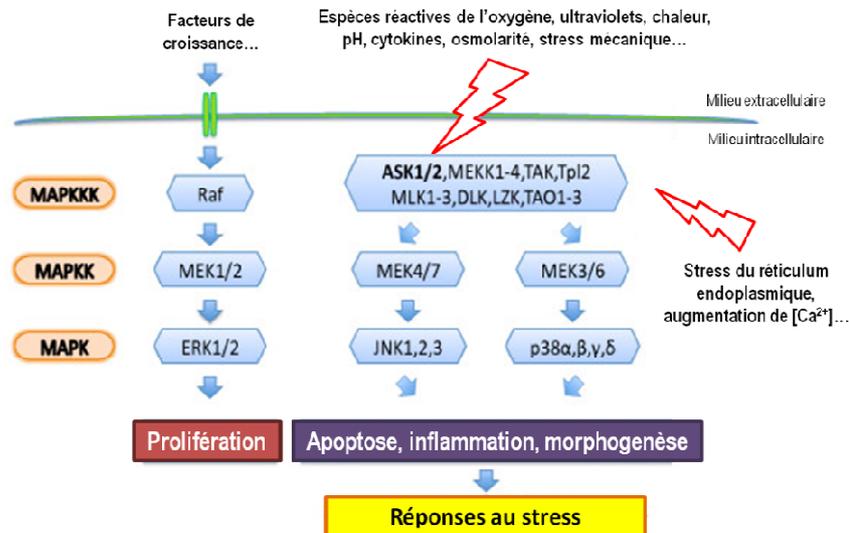
Cependant, dans les cas où le stress appliqué est trop important, il va induire des dommages irréversibles et la cellule va alors rentrer en apoptose.

1.2.1.1. Arrêt du cycle cellulaire et dommages à l'ADN

Le stress hyperosmolaire provoque des dommages à l'ADN, notamment *via* des cassures double brin (147). Ces dommages entraînent alors un arrêt du cycle cellulaire avec une interruption de la réplication de l'ADN lié à l'activation et à l'accumulation de la protéine p53 (146,156). Cet arrêt du cycle est très important car il permet de laisser à la cellule le temps de mettre en place les phénomènes d'adaptation qui vont contrecarrer les effets de ce déséquilibre osmotique. L'arrêt du cycle cellulaire, dépendant du niveau d'hyperosmolarité auquel les cellules sont soumises, concerne toutes les phases du cycle (150) et activerait le facteur de transcription NFAT5 (157).

Lorsque la cellule survit au stress en réussissant à s'adapter, des mécanismes de réparation de l'ADN se mettent en place et sont accompagnés d'une augmentation de la synthèse des protéines impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN. Les réponses classiques aux cassures double brin de l'ADN sont l'activation de protéines kinases telles que *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM) et *Ataxia Telangiectasia and Rad3-related* (ATR) ou l'induction des protéines *growth arrest and DNA damage inductible protein* (GADDs) comme GADD45 et GADD153 (158). La cellule va pouvoir ensuite reprendre sa réplication.

Il a été montré que ces différents événements au niveau du cycle cellulaire étaient en partie médiés par les voies de signalisation des *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), particulièrement *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) et *kinase p38 MAPK* (p38) (158). Les MAPKs sont une famille de kinases composée de : p38, ERK et *c-Jun NH₂-terminal kinase* (JNK). Ce sont des médiateurs intracytoplasmiques classiques qui permettent la transmission de signaux extracellulaires vers le noyau. Elles régulent des activités cellulaires très nombreuses et variées comme la croissance cellulaire, la différenciation, la survie ou la mort cellulaire (159). Généralement, l'activation de p38 et de JNK est associée à l'inhibition du cycle cellulaire et l'apoptose alors que ERK stimulerait plutôt les réponses prolifératives. Elles sont également considérées comme étant parmi les voies majeures des signaux régulant les réponses cellulaires au stress (Figure 18). Il existe de nombreux activateurs déjà identifiés de ces voies tels que les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β , ainsi qu'une large variété de stress cellulaires tels que les radiations ultraviolettes ou ionisantes, les chocs thermiques, le stress oxydant ou le stress hyperosmolaire.



In Hattori et al., 2009 (160)

Figure 18. La cascade des *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) en réponse à différents stress, facteurs de croissance, espèces réactives de l'oxygène, rayons ultraviolets, osmolarité, cytokines, stress du réticulum endoplasmique.

Si la réparation n'a pas été efficace ou si les dommages liés à l'hyperosmolarité sont trop importants, la cellule va entrer en apoptose (161).

L'hyperosmolarité est également génératrice de stress oxydant en induisant l'augmentation d'EROs (162–165). Celles-ci peuvent induire de nombreux dommages cellulaires avec des modifications des bases de l'ADN et une altération des protéines entraînant la perte de leurs propriétés biologiques. Lors d'un stress hyperosmolaire, l'apparition de stress oxydant participerait aussi à l'activation des processus d'adaptation en stimulant l'expression de protéines de réparation de l'ADN telles que GADD153 ainsi qu'en activant NFAT5 (164,166).

1.2.1.2. Régulation du volume cellulaire

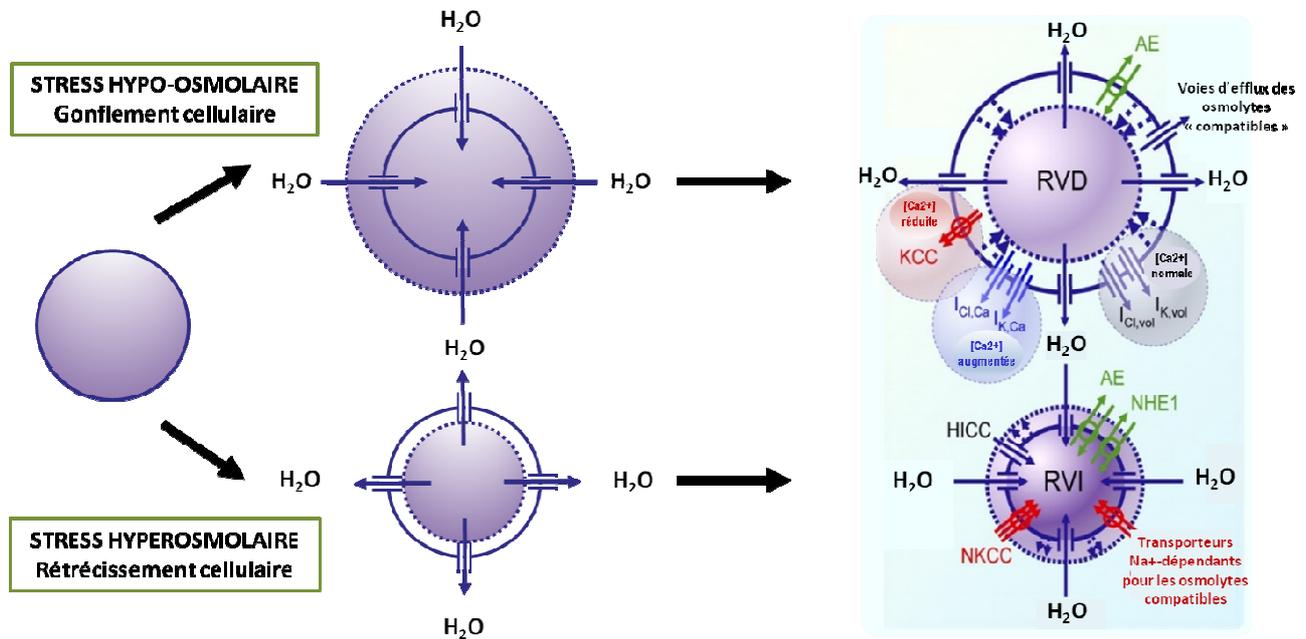
Le volume des cellules est régulé constamment par des mouvements d'eau et d'électrolytes au travers de la membrane plasmique *via* différents canaux et transporteurs qui vont conduire au gonflement ou à la réduction du volume cellulaire en fonction des conditions. Ces changements de volume vont être particulièrement importants lors des changements d'osmolarité du milieu extérieur.

Le stress hyperosmolaire induit rapidement une diminution du volume cellulaire. La régulation du volume cellulaire se met ensuite en place pour restaurer le volume initial de la cellule. Pour cela, la cellule va rapidement mettre en œuvre le RVI, un phénomène durant lequel l'eau et les électrolytes sont captés dans la cellule afin de restaurer son volume, et cela dans le but de conserver une osmolarité égale à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule.

A l'opposé, lors d'un stress hypo-osmolaire, un gonflement cellulaire par accumulation d'eau va se produire, puis la cellule va mettre en place le *Regulatory Volume Decrease* (RVD) qui permettra l'efflux d'eau et d'électrolytes hors de la cellule et la restauration du volume cellulaire initial. Ces régulations mettent en jeu des mouvements d'eau ainsi que l'entrée ou la sortie d'ions grâce à des systèmes de transport d'influx de NaCl pour le RVI ou d'efflux de KCl pour le RVD.

1.2.1.2.1. Systèmes de transport impliqués dans le RVI et le RVD

Les systèmes de transport ionique peuvent être classés selon qu'ils interviennent au cours du RVI ou du RVD (Figure 19).



Adapté de Hoffmann et al., 2009 (167)

Figure 19. Phénomènes de régulation du volume cellulaire (RVD et RVI) - RVD : l'antiport $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (AE), les canaux potassium ou chlorure sensibles au volume ($I_{K,vol}$) ($I_{Cl,vol}$), les canaux potassium ou chlorure activés par le calcium ($I_{K,ca}$) ($I_{Cl,ca}$), le cotransporteur K^+/Cl^- (KCC). RVI : l'antiport $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (AE), l'antiport Na^+/H^+ (NHE), le cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (symport) (NKCC) et les canaux à cations induits par l'hypertonie (HICC).

Dans un stress hyperosmolaire, la cellule va se rétrécir et le phénomène de **RVI** va se mettre en place. Ce phénomène est basé sur l'entrée couplée d'eau et de sodium à l'intérieur de la cellule. Il met principalement en jeu :

- les échangeurs Na^+/H^+ antiport (NHE) et $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ antiport (AE) (168–170),
- les cotransporteurs $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (symport) (NKCC) et Na^+/Cl^- (antiport) (171,172),
- les canaux perméables au sodium appelés *Na⁺/permeable nonselective cation* (NSC) (173),
- les canaux *epithelial sodium channels* (ENaCs) (174,175),
- les canaux *transient receptor potential vanilloid channels* (TRPV) (176),
- les canaux à cations appelés *hypertonicity-induced cation channels* (HICCs) activés par le rétrécissement cellulaire.

L'eau va suivre le flux sodique à l'intérieur de la cellule et ainsi contribuer au RVI (169). L'hyperosmolarité stimule certains de ces canaux impliqués dans la restauration du volume cellulaire RVI, tels que le NKCC ou le TRPV (176,177). Notons que ces canaux peuvent également être modulés par d'autres stimuli, comme c'est le cas du TRPV qui peut être modulé par certains médiateurs inflammatoires (178). Il a également été montré que les MAPKs avaient un rôle dans le phénomène de RVI et dans la stimulation de certains de ces canaux, le TRPV notamment (176,179).

Lors d'un stress hypo-osmolaire, la cellule va gonfler et le phénomène de **RVD** va se mettre en place. Dans le RVD, plusieurs transporteurs majeurs entrent en jeu afin de contribuer à l'efflux d'ions potassium et chlorure hors de la cellule accompagnés de la sortie d'eau :

- le cotransporteur K^+/Cl^- (KCC) (symport) (180,181),
- le canal d'efflux de potassium (K^+/H^+) (antiport),
- le canal d'efflux de chlorure (Cl^-/HCO_3^-) (antiport),
- les canaux ioniques au potassium (*volume-sensitive- $I_{K,vol}$* ou *Ca^{2+} -activated- $I_{K,Ca}$ potassium channel*) ainsi que ceux au chlorure (*volume-sensitive- $I_{Cl,vol}$* ou *Ca^{2+} -activated- $I_{Cl,Ca}$ chloride channel*)
- le canal *volume-sensitive outwardly rectifying Cl channel* (VSOR) (182).

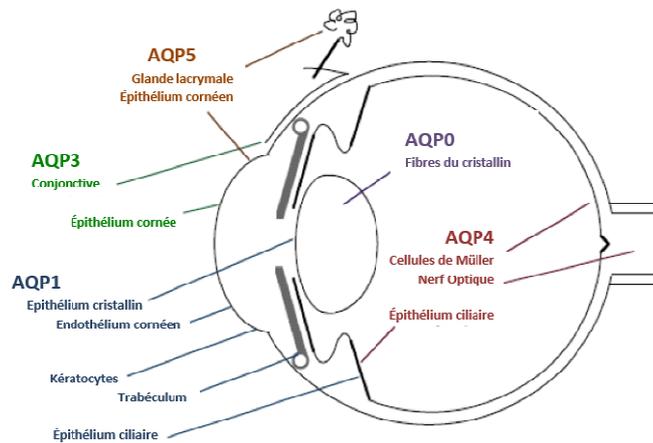
La sortie d'adénosine triphosphate (ATP) (183) ou celle d'osmolytes "compatibles" comme la taurine (184) peut également participer au RVD.

La présence à la surface de l'œil des canaux impliqués dans le RVI et le RVD a été rapportée dans plusieurs études. Les canaux EnaC ont été mis en évidence dans de nombreux tissus de l'œil, dont la conjonctive et la cornée notamment (185–187). Les canaux TRPV sont également présents à la membrane des cellules épithéliales conjonctivales et cornéennes et leur rôle dans les conditions hyperosmolaire a été démontré sur ces types cellulaires (176,188). Sur les cellules cornéennes, il a été mis en évidence que le TRPV1 était en partie responsable de la libération des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 *via* la voie des MAPKs induite par l'hyperosmolarité (176,189). Les canaux NKCC ont également été détectés sur les cellules cornéennes (190). Il a été observé que leur activation était dépendante de p38 et qu'ils possédaient un rôle dans le RVI induit par l'hyperosmolarité (171,172). Les canaux KCC ont également été identifiés dans les cellules cornéennes et leur rôle dans le RVD a été confirmé (181).

1.2.1.2.2. Aquaporines

Parallèlement à la régulation du volume cellulaire par les canaux ioniques, des canaux perméables à l'eau et à certains osmolytes, les aquaporines (AQPs), entrent en jeu. Les AQPs sont des petites protéines insérées dans la membrane qui forment des pores dans celle-ci. Leur fonction principale est de faciliter les mouvements d'eau entre l'extérieur et l'intérieur de la membrane en fonction des gradients osmotiques (191,192). La perméabilité des AQPs permet de les classer en deux groupes : les AQPs "classiques" perméables uniquement à l'eau (AQP-0/1/2/4/5/6/8) et les aquaglycéroporines (AQP-3/7/9/10) perméables à l'eau, au glycérol ainsi qu'à d'autres molécules de faible taille (193). Les AQPs augmentent ainsi la perméabilité de la membrane plasmique dans laquelle elles sont insérées, une membrane déjà perméable par phénomène d'osmose. Il a en outre été montré que l'expression d'AQP1 et d'AQP2 était augmentée en cas de stress hyperosmolaire (177,194) et que ces conditions induisaient également AQP5, *via* la voie de signalisation ERK (195).

Les AQPs sont également largement présentes au niveau de l'œil, avec une distribution spécifique (191,196) (Figure 20). Concernant la surface oculaire, l'AQP1 est présente au niveau de l'endothélium cornéen. L'AQP3 est présente dans l'épithélium cornéen et la conjonctive où son expression est augmentée dans un modèle murin de sécheresse oculaire (197). L'AQP5 est présente sur l'épithélium cornéen et dans les glandes lacrymales, où elle participerait à la sécrétion des larmes (198).



In Verkman, 2008 (191)

Figure 20. Sites d'expression des AQPs dans l'œil.

1.2.1.3. Le facteur de transcriptions NFAT5

En plus de ces canaux, d'autres facteurs entrent en jeu, parmi lesquels les facteurs de transcription qui vont permettre la mise en place de systèmes d'adaptation au stress hyperosmolaire via une induction génique.

NFAT5, également appelé *Osmotic Response Element-binding Protein* (OREBP) ou *tonicity-responsive enhancer binding protein* (TonEBP), est un membre de la famille des *nuclear factors of the activated T cells* (NFAT). Il est cependant considéré comme étant un membre un peu particulier car il ne possède pas le domaine de liaison à la calcineurine qui est essentiel à l'activation des autres membres de la famille NFAT (de 1 à 4). L'hyperosmolarité est le facteur d'activation de NFAT5 le plus étudié, en raison du rôle majeur de ce facteur de transcription dans l'adaptation et la survie des cellules à ce type de stress (155). L'activation de cette protéine se fait après phosphorylation par des kinases et elle a lieu dans les 30 premières minutes d'un stress hyperosmolaire (134). L'hyperosmolarité agit en augmentant le taux d'ARN messager (ARNm) et le taux protéique intracytoplasmique de NFAT5 ainsi qu'en induisant son activation et sa translocation dans le noyau où il va ensuite induire la transcription de plusieurs gènes cibles (199–201). Elle induit également une amélioration de son activité transcriptionnelle. Il existe, dans les conditions hyperosmolaires, différents mécanismes identifiés qui induisent l'augmentation de son activité transcriptionnelle. C'est le cas des dommages cellulaires induits par l'hyperosmolarité qui vont stimuler les systèmes de réparation tels qu'ATM, une kinase démontrée comme impliquée dans l'activation de NFAT5 (202,203). D'autres kinases ont été identifiées comme ayant un rôle dans l'activation de NFAT5 dans des conditions hyperosmolaires : les protéines kinases A (PKA) (204), la tyrosine kinase FYN (205) ou encore la protéine kinase C alpha (PKC- α) et les MAPKs (206). En outre, il a aussi été montré que la production d'EROs induites par l'hyperosmolarité contribuait également à l'activation de ce facteur de transcription (164).

Tous les gènes cibles de NFAT5 comportent au niveau de leur site de régulation une séquence appelée *osmotic response element* (ORE) ou *tonicity-responsive enhancer* (TonE) (207,208). Dans des conditions d'hyperosmolarité, les gènes cibles de NFAT5 sont les gènes appelés gènes "osmoprotecteurs" et vont permettre à la cellule de s'adapter et de survivre dans ces conditions particulières (209).

Afin de restaurer l'homéostasie biochimique, les électrolytes accumulés dans un premier temps lors d'un stress hyperosmolaire sont petit à petit remplacés par des osmolytes "compatibles" tels que le sorbitol, la bétaine, le myo-inositol ou la taurine (210). Ces molécules vont alors s'accumuler dans la cellule, ceci sans perturber son fonctionnement, et elles vont permettre le maintien d'une hyperosmolarité équilibrée avec l'environnement extérieur (211–214). L'activation de NFAT5 va conduire à cette accumulation *via* la stimulation de l'expression de gènes "osmoprotecteurs" codant pour les principaux acteurs mis en jeu lors de ce phénomène (215). Il s'agit des enzymes capables de synthétiser ces osmolytes et des transporteurs spécifiques responsables de leur recapture vers l'intérieur de la cellule (216). C'est le cas de l'aldose réductase (AR) qui synthétise le sorbitol, ainsi que des transporteurs responsables de la recapture de la bétaine, du myo-inositol et de la taurine : respectivement, le transporteur de la bétaine (BGT1) (217), le cotransporteur sodium/myo-inositol (SMIT) et le transporteur de la taurine sodium/chlore-dépendant (TAUT) (218).

NFAT5 agit également sur d'autres types de gènes "osmoprotecteurs", induisant ainsi les protéines 70 kilodalton *heat shock proteins* (HSP70) (219), des protéines chaperonnes essentielles à la survie en condition hyperosmolaire (220).

En plus de ces mécanismes osmoprotecteurs, d'autres gènes cibles de NFAT5 activés par l'hyperosmolarité ont été identifiés (Tableau 3).

Types	Name	Function	Evidences (R/E/C/I)*	Refs.
Transporters	Betaine/ γ -aminobutyric acid transporter (BGT1)	Uptake of betaine.	R, E	[15,18,27]
	Sodium dependent myo-inositol transporter (SMIT)	Uptake of myo-inositol.	R, E, I	[17,28]
	Taurine transporter (TAUT)	Uptake of taurine.	R, I	[29]
	Urea transporter (UT-A)	Transport urea.	R, E, I	[34,36]
	Aquaporin 1 (AQP1)	Water channel.	R, C, I	[35]
	Aquaporin 2 (AQP2)		R, C, I	[36,37,57]
	Aquaporin 4 (AQP4)		C, I	[58]
Kinases	Sgk1	Involved in dehydration natriuresis.	R, E, C, I	[38,51]
Chaperones	HSP70	Heat shock protein	R, E, I	[28,30]
Enzymes	Aldose reductase (AR)	Converts glucose to sorbitol.	R, I	[19,26,28]
	β 1,3-Glucuronosyltransferase-I	Synthesis of Glycosaminoglycan	R, C, I	[48]
	Aromatic l-amino acid decarboxylase (AAD)	Synthesis of dopamine.	R, E, I	[59]
	Inducible nitric oxide synthase (iNOS)	Synthesis of nitric oxide.	R, C, I	[54]
Cytochrome	CYP2E1	Metabolism of xenobiotics.	R, E, I	[42]
	CYP3A7		R, E, I	[43]
Cell adhesion molecules	CD24	T cell proliferation and conversion to memory cells.	C, I	[45]
Cytokines	TNF- α	Cytokines.	E, C, I	[25,46]
	IL-6		R, C, I	[54]
	Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)	Recruitment of monocytes and T cells to inflammatory region.	R, E, I	[49,50]
Growth factors	VEGFC	Lymphangiogenesis	E, C	[40]
Others	S100A4/metastasin-1	Cell motility and tumor metastasis.	R, C, I	[60-62]

*R – Reporter gene assay, E – EMSA, C – ChIP, I – Inhibition of NFAT5 (gene knockdown/gene knockout).

In Cheung et al., 2006 (155)

Tableau 3 : Cibles moléculaires de NFAT5 induites par l'hyperosmolarité.

Notons que NFAT5 peut être activé par une voie indépendante de l'hyperosmolarité et jouerait alors un rôle dans le développement, la fonction immunitaire et la réponse aux stress cellulaires.

Concernant particulièrement la surface oculaire, NFAT5 a été identifié comme activé et transloqué dans le noyau des cellules limbiques sous l'effet d'un stress hyperosmolaire (221). En outre, une autre étude sur des cellules cornéennes a confirmé que l'hyperosmolarité conduisait à une augmentation de la recapture de taurine sur ces cellules (211).

1.2.1.4. La mort cellulaire induite par un stress hyperosmolaire

Lorsque les systèmes d'adaptation à des conditions hyperosmotiques sont dépassés et insuffisants pour assurer une survie, la mort cellulaire par apoptose va être déclenchée (222,223). Son déclenchement va dépendre du type cellulaire, du type de stress, de son intensité et de sa durée. Les cellules soumises à un stress hyperosmolaire et entrées dans le phénomène d'apoptose présentent les changements morphologiques classiquement observés lors de ce phénomène de mort cellulaire (224,225), comme une diminution du volume cellulaire avec maintien de l'intégrité de la membrane plasmique et des organites intracellulaires, une condensation de la chromatine, une fragmentation de l'ADN et du noyau, une externalisation des résidus phosphatidylsérine de la membrane, un bourgeonnement cellulaire puis un détachement de la cellule avec formation de corps apoptotiques (226,227).

1.2.1.5. Effets pro-inflammatoires de l'hyperosmolarité

Un nombre croissant d'études démontre l'effet pro-inflammatoire des conditions hyperosmotiques, notamment *via* l'induction de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-8, IL-6, IL-1 β et TNF- α sur différents types cellulaires tels que les cellules mononucléées du sang, les macrophages, les cellules endothéliales par exemple (228–233) et certaines ont montré l'implication des MAPKs dans ces phénomènes inflammatoires (234–237).

Dans le cadre de la sécheresse oculaire, les effets, en termes d'inflammation entraînée par l'hyperosmolarité sur les cellules de la surface oculaire, ont été étudiés également et seront détaillés dans la partie relative aux modèles expérimentaux hyperosmotiques *in vivo* et *in vitro* de sécheresse oculaire.

Ces études liant hyperosmolarité et inflammation sont la base de théories récentes impliquant le déséquilibre osmotique dans certaines pathologies chroniques inflammatoires telles que la sécheresse oculaire, mais également certaines maladies inflammatoires de l'intestin ou du foie (238,239).

1.2.2. Sécheresse oculaire et inflammation - Rôle de l'hyperosmolarité

1.2.2.1. L'inflammation

1.2.2.1.1. Généralités

L'inflammation est la réaction déclenchée par un organisme vivant en réponse à une agression. Ces agressions peuvent être physiques (blessure, chaleur, froid), chimiques (toxique, irritant...) ou liées à une infection par un agent pathogène. Cette réponse physiologique de l'organisme a lieu dans les tissus vascularisés et met en jeu les cellules immunitaires (les

polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes et les macrophages), les vaisseaux sanguins et des médiateurs moléculaires. La cascade d'évènements déclenchée a pour but d'éliminer la cause initiale de l'agression, puis de nettoyer le site des cellules mortes et des tissus abimés et de réparer les lésions tissulaires. Les cellules du foyer inflammatoire proviennent majoritairement du sang, mais peuvent provenir du tissu lui-même comme c'est le cas des macrophages tissulaires.

La première étape de l'inflammation est la phase dite "vasculaire" qui consiste en une dilatation et une perméabilisation des vaisseaux sanguins couplées à la production de molécules chimiotactiques ayant la capacité d'attirer les cellules de l'inflammation. Les leucocytes sont tout d'abord attirés contre les parois vasculaires suite à l'intervention, entre autres, des couples CX3CL1/fractalkine et son récepteur CX3CR1, CCL2 et son récepteur CCR2, ainsi que de la protéine *intracellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) qui se lie à *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1). Simultanément, les leucocytes vont rouler contre les parois vasculaires (phénomène de "rolling") et accéder alors, par un phénomène de diapédèse, à l'intérieur du tissu pour participer au phénomène inflammatoire. Les granulocytes (polynucléaires neutrophiles, essentiellement) libèrent des granules riches en enzymes et des médiateurs inflammatoires qui vont développer et maintenir la réponse inflammatoire. La résolution de l'inflammation fait intervenir ensuite un mécanisme de détertion avec élimination par les macrophages des éléments étrangers ou nécrosés présents sur le site. Elle est suivie d'une phase de réparation/cicatrisation qui met en jeu les fibroblastes qui synthétisent du collagène.

L'inflammation est donc un mécanisme d'immunité innée qui se met en place dès l'arrivée de l'agression, quelle qu'elle soit. Bien que physiologique au départ et indispensable pour assurer la défense de l'organisme envers toute agression menaçant l'intégrité de l'organisme, ce processus se révèle parfois néfaste lorsqu'il persiste; ceci par anomalie des régulations du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation. Une situation d'inflammation chronique hors de contrôle apparaît alors et conduit à un autoentretien constant de phénomènes délétères pour l'organisme au niveau du site concerné. L'enjeu des thérapies traitant ces inflammations chroniques est donc d'essayer d'enrayer cet emballement non régulé du processus inflammatoire.

De façon empirique, il existe quatre signes cliniques classiques caractérisant l'inflammation : la rougeur, la chaleur, la douleur et le gonflement (œdème). Dans la plupart des maladies inflammatoires chroniques, ce dogme de l'inflammation est remis en question car l'ensemble de ces symptômes n'est pas toujours présent dans ces pathologies malgré une composante inflammatoire biologiquement indiscutable. C'est le cas dans la sécheresse oculaire. En effet, cliniquement, les quatre signes classiques ne sont pas réunis, car seule la douleur est rapportée par certains patients et souvent celle-ci est exprimée diversement. Il n'est donc pas possible de déceler ce phénomène inflammatoire uniquement par un examen clinique simple de l'œil. C'est alors l'utilisation de techniques plus spécifiques d'analyse de l'unité fonctionnelle lacrymale qui a permis d'observer l'infiltration de cellules immunes à la surface de l'œil ainsi que la présence de médiateurs de l'inflammation dans les larmes et dans la surface oculaire de ces patients, apportant la preuve d'une composante inflammatoire indiscutable. Ces observations sur les patients souffrant de cette maladie ont été complétées lors de nombreuses expérimentations *in vivo* et *in vitro* de la maladie confirmant l'apparition de ce phénomène inflammatoire. Enfin, l'efficacité indiscutable des traitements anti-inflammatoires dans cette pathologie achève de confirmer l'intérêt de comprendre ce phénomène afin notamment d'améliorer l'arsenal thérapeutique pour traiter la maladie.

1.2.2.1.2. Les marqueurs de l'inflammation étudiés dans la sécheresse oculaire

1.2.2.1.2.1. Les médiateurs moléculaires de l'inflammation

Les observations établissant un lien fondamental entre la sécheresse oculaire et l'inflammation décrivent la présence de différents médiateurs moléculaires de l'inflammation (240) :

- Les **cytokines** sont des molécules de signalisation qui permettent la communication intracellulaire et l'orientation de la réponse cellulaire. Les cytokines pro-inflammatoires majeures sont IL-1, IL-6 et TNF- α .
- Les **chimiokines** sont des cytokines chimioattractantes sécrétées par de nombreuses cellules sentinelles après stimulation par des signaux de danger. Elles vont former un gradient chimique qui va diriger la migration des cellules immunitaires requises vers le tissu où a lieu l'inflammation. Les chimiokines pro-inflammatoires principales sont IL-8/CXCL8, CCL2 (également appelé *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1)), CXCL1 (également appelé *Growth-regulated protein alpha* (Gro- α)), CXCL2 (également appelé *Growth-regulated protein beta* (Gro- β)) et CCL5 (également appelé *Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted* (RANTES)).
- Les **MMPs** sont des endopeptidases impliquées dans le remodelage des tissus (241). Ce sont des enzymes dégradant les protéines structurales de la matrice extracellulaire, qui coupent également des molécules de la surface cellulaire ou des molécules péricellulaires n'appartenant pas à la matrice. En régulant le comportement cellulaire et en modifiant de nombreuses protéines, elles peuvent ainsi influencer divers processus, y compris l'inflammation (242).
- Le **complexe majeur d'histocompatibilité de classe II** (CMH II) comme le HLA-DR est impliqué dans la présentation d'antigène. HLA-DR est actuellement le meilleur marqueur d'inflammation au niveau de la surface oculaire. Les **molécules de costimulation** CD40, CD40L (appelé également CD154), CD80, and CD86 sont impliquées dans les interactions cellules présentatrices de l'antigène-cellules T. La présence de ces molécules immunomodulatrices traduit une infiltration cellulaire, car ces molécules régulent l'activité des cellules immunitaires.
- Les **molécules d'adhésion** sont des protéines de la surface cellulaire qui facilitent la migration cellulaire en se liant aux composés de la matrice extracellulaire. Elles favorisent ainsi l'infiltration des cellules de l'immunité. Les molécules d'adhésion principalement étudiées dans l'œil sec sont ICAM-1 et *vascular cell adhesion protein-1* (VCAM-1).

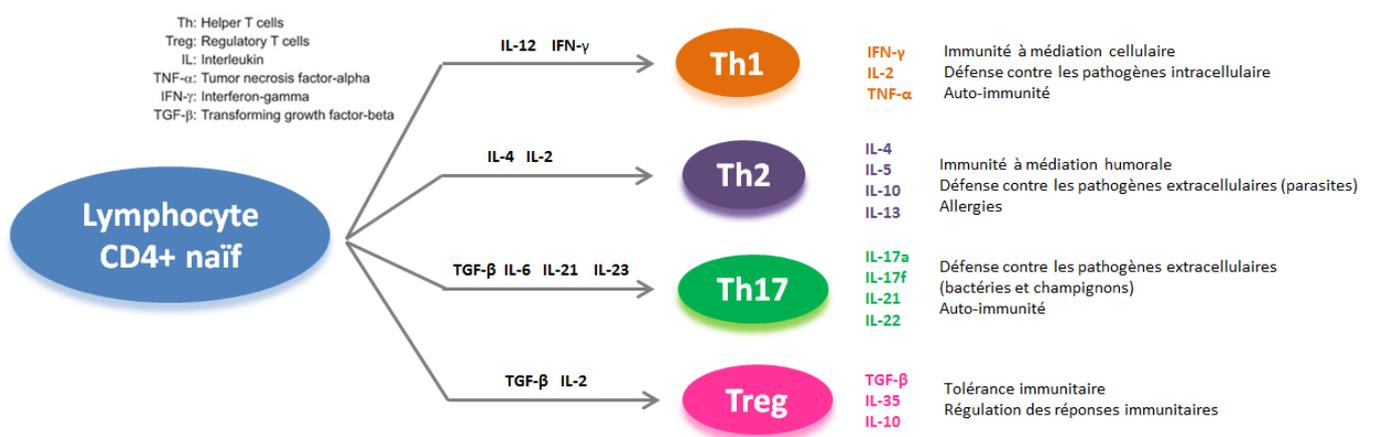
Dans ce travail, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'un de ces médiateurs moléculaires, la chimiokine CCL2. C'est une des chimiokines les plus étudiées, car considérée comme une des chimiokines clé qui joue un rôle majeur dans la surveillance et la modulation immunitaire. Cette chimiokine régule principalement la migration et l'infiltration des monocytes/macrophages au niveau du site de l'inflammation (243) ainsi que la migration et l'infiltration des lymphocytes T mémoires et des cellules NK. D'autres études lui prêtent également un rôle dans l'immunité mettant en jeu les lymphocytes T. Elle est produite par de nombreux types cellulaires, tels que les fibroblastes, les cellules endothéliales, épithéliales, mésangiales et monocytaires (244–247). Sa

sécrétion est constitutive ou déclenchée par divers stimuli comme le stress oxydant, d'autres cytokines ou des facteurs de croissance. L'hyperosmolarité a également été démontrée comme étant un inducteur de sécrétion de CCL2 par différents types cellulaires tels que les cellules mésothéliales ou cornéennes (248–251). CCL2 agit au travers de son récepteur CCR2 qui est présent sur un cercle restreint de types cellulaires. Il existe sous 2 isoformes, CCR2A qui est l'isoforme majeur, présent sur les cellules musculaires lisses vasculaires, alors que les monocytes et les cellules *natural killer* (NK) activées expriment majoritairement le CCR2B (252). Cette chimiokine a été identifiée comme ayant un rôle potentiel dans différentes maladies telles que l'arthrite rhumatoïde (253), la sclérose en plaques (254) ou l'athérosclérose (255).

1.2.2.1.2.2. Les médiateurs cellulaires de l'inflammation

L'inflammation dans la sécheresse oculaire est également détectée du fait de la présence à la surface de l'œil ou dans les tissus oculaire de médiateurs cellulaires immunitaires de l'inflammation :

- Les **cellules présentatrices de l'antigène** (CPAs) sont les cellules sentinelles du système immunitaire. Elles répondent aux signaux de danger, notamment les pathogènes microbiens, en internalisant et présentant les antigènes provenant de ceux-ci. Le phénotype, ou le stade de maturation, des CPAs détermine leur fonction. Les CPA immatures expriment peu de CMH II et de molécules de costimulation. Elles peuvent capturer des antigènes mais ne peuvent les présenter et induire ainsi l'activation des cellules T. Un microenvironnement inflammatoire peut conduire à la maturation de ces cellules en augmentant à leur surface le CMH II et les molécules de stimulation, les rendant alors aptes à activer des cellules T. Dans la surface oculaire, les CPAs impliquées sont des monocytes, des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules de Langerhans.
- Les **cellules T effectrices *T helper*** (Th) sont des lymphocytes Th0 (CD4+) qui se sont différenciés suivant les signaux reçus lors de leur interaction initiale avec l'antigène (256,257) (Figure 21).



In Rapport de la SFO - Surface oculaire, 2015 (1)

Figure 21. Différenciation des lymphocytes CD4+ en fonction des cytokines auxquelles ils sont exposés.

Les lymphocytes **Th1** jouent un rôle dans la réponse immunitaire contre les pathogènes intracellulaires *via* leur interaction avec les macrophages, principalement par le biais de l'immunité à

médiation cellulaire. La voie Th1 maximise le pouvoir tueur des macrophages et induit la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques (CD8+). Elle stimule en outre la production d'anticorps opsonisants. La cytokine signature de ces lymphocytes est l'interféron- γ (IFN- γ). Les autres cytokines intervenant dans les réactions de type Th1 sont : TNF- α , IL-2 et IL-12 (258). Les lymphocytes Th1 expriment préférentiellement à leur surface les récepteurs de chimiokines CXCR3 (dont les ligands sont CXCL9, CXCL10 et CXCL11) et CCR5 (dont le ligand est CCL5).

Les lymphocytes **Th2** jouent un rôle dans la défense contre les pathogènes extracellulaires et possèdent aussi un rôle dans les réactions d'allergie. Cette voie Th2 favorise le système immunitaire à médiation humorale *via* la stimulation de la prolifération des lymphocytes B. Les cytokines qui interviennent dans ces réactions sont essentiellement : IL-4, qui est un facteur clé dans l'activation des Th2, IL-5, IL-10 et IL-13. Les cellules Th2 expriment à leur surface les récepteurs de chimiokines CCR3 et CCR4 (259).

Les lymphocytes **Th17** sont impliqués dans la réponse précoce à de nombreux agents pathogènes extracellulaires, parmi lesquels les bactéries et les champignons, dans l'auto-immunité et dans l'inflammation des tissus. *Transforming growth factor- β* (TGF- β) ainsi que IL-6, IL-21 et IL-23 sont impliqués dans la différenciation des lymphocytes auxiliaire naïfs en lymphocytes Th17 (260). Les lymphocytes Th17 sécrètent IL-17 (17a et 17f), qui induit la production de molécules pro-inflammatoires telles que IL-6 et IL-8 leur conférant ainsi un rôle important dans l'induction de la réponse inflammatoire le recrutement des neutrophiles (261,262). Les lymphocytes Th17 produisent également IL-21 et IL-22. Les cellules Th17 peuvent être identifiées par l'expression de récepteurs de surface tels que CCR6.

- Les **cellules T régulatrices** (Treg) sont des lymphocytes CD4+ ayant des fonctions immunomodulatrices qui leurs permettent de réguler les réponses immunitaires. Ils participent à la tolérance immunitaire en régulant les lymphocytes T effecteurs *via* leur action immunosuppressive. TGF- β joue un rôle majeur dans la différenciation des lymphocytes Th0 naïfs en Treg et est nécessaire, avec IL-2, à leur survie et leur fonctionnement. Ces lymphocytes sont essentiels pour la tolérance aux antigènes du soi et la régulation des réponses immunitaires. Ils inhibent en effet les réponses des autres lymphocytes T (CD4+ et CD8+) par différents mécanismes encore peu connus mais notamment en sécrétant des cytokines suppressives (IL-10, TGF- β ou IL-35) (263).

- Les **cellules NK** sont des lymphocytes granuleux manifestant une cytotoxicité spontanée envers les cellules anormales et qui peuvent rapidement sécréter de nombreuses cytokines ou chimiokines pro-inflammatoires permettant de promouvoir une réponse immunitaire adaptée.

1.2.2.1.2.3. La voie particulière de l'inflammasome, plateforme d'activation d'IL-1 β

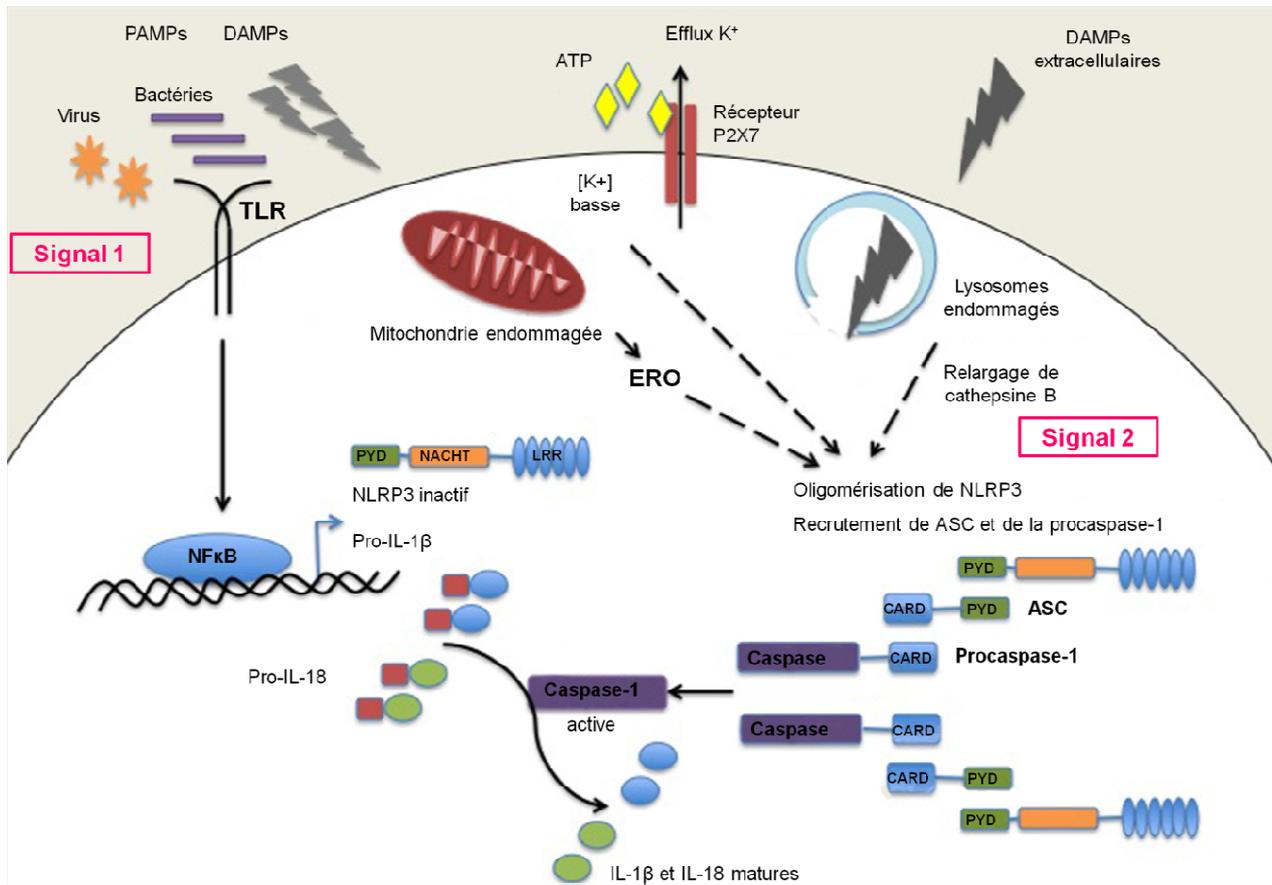
IL-1 β étant une cytokine majeure impliquée dans la sécheresse oculaire, comme nous allons le voir lors de l'analyse des données expérimentales publiées, des études récentes ont analysé une voie plus spécifique de l'inflammation, appelée inflammasome, qui conduit à la sécrétion de cette cytokine.

Les inflammasomes sont des complexes protéiques oligomériques qui ont un rôle très important dans l'immunité innée (264). Ils sont considérés comme des plateformes de signalisation qui répondent à différents éléments microbiens, notamment les *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) qui sont des motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes. Les inflammasomes peuvent également être activés par des produits endogènes résultant de stress ou dommages cellulaires. Ces stimuli sont reconnus par des récepteurs spécifiques tels que les récepteurs de la famille des *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor* (Nod-receptor ou NLR), présentant plusieurs membres : *Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing 1, -2, -3* (NLRP1, NLRP2, NLRP3), ou le récepteur *absent in melanoma 2* (AIM2). Sous l'effet du stimulus, ils s'oligomérisent et recrutent la protéine adaptatrice *apoptosis-related speck-like protein containing a caspase recruitment domain* (ASC) ainsi que la procaspase-1. Ceci conduit à l'autocatalyse et à l'activation de cette caspase qui clive ensuite les formes inactives des interleukines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 et induit leur sécrétion (265). Notons que la caspase-1 activée peut aussi déclencher une forme de mort cellulaire appelée pyroptose (266).

Contrairement à la plupart des cytokines, IL-1 β et IL-18 sont produites sous forme de précurseurs inactifs qui doivent être clivés avant sécrétion par les monocytes, les macrophages et d'autres types cellulaires activés (267). L'expression d'IL-1 β est régulée par une transcription dépendante de *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF κ B). NF κ B est un facteur de transcription régulant de nombreux processus physiologiques, comme la réponse immunitaire innée ou adaptative, la mort cellulaire ou l'inflammation (268). IL-1 β a pour rôle de réguler les réponses systémiques et locales aux infections et aux blessures en jouant un rôle dans les réponses immunologiques. En effet, IL-1 β est une cytokine pyrogène qui induit l'activation des lymphocytes et favorise la migration des leucocytes au site de l'infection ou de la blessure (267).

L'inflammasome actuellement le plus étudié est NLRP3. Bien que le mécanisme moléculaire exact de son assemblage ne soit pas encore complètement élucidé, il est néanmoins démontré que son activation requiert deux signaux consécutifs. En effet, la pro-IL-1 β n'étant pas présente dans les cellules à l'état basal et le taux de protéine NLRP3 étant très faible, ceci empêche une activation directe de l'inflammasome. Il est donc nécessaire d'avoir un premier signal, dit de "*priming*", qui va déclencher l'expression de pro-IL-1 β et une expression optimale de NLRP3 *via* l'activation du facteur de transcription NF κ B (269). Ces premiers signaux peuvent être les activateurs de *Toll-like receptors* (TLR) comme les PAMPs, connus pour activer la voie de signalisation de NF κ B ou les *danger* ou *damage associated molecular patterns* (DAMPs). Les activateurs les plus utilisés sont ainsi le lipopolysaccharide (LPS), un composant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif qui stimule les récepteurs TLR4, ainsi que l'acide lipoteichoic (LTA), un composant de la membrane des bactéries à Gram positif stimulant les récepteurs TLR2. L'assemblage de l'inflammasome NLRP3 se met en place quand un second signal, l'activateur de l'inflammasome proprement dit, est reçu par la cellule. Un des plus classiques est l'ATP (270), mais il en existe d'autres comme l'acide urique (271). Ces activateurs vont procurer un deuxième signal sous forme d'une diminution de la concentration intracellulaire de K⁺ (272), d'un relargage de cathepsines lysosomales ou d'un relargage de facteurs issus de la mitochondrie comme les EROs. Ce sont ces signaux qui vont induire l'oligomérisation du NLRP3 et la suite de la cascade de réactions jusqu'à la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 (Figure 22).

L'inflammasome a déjà été démontré comme ayant un rôle potentiel dans certaines pathologies inflammatoires chroniques telles que l'athérosclérose ou la goutte (273) et son intérêt dans la sécheresse oculaire est de plus en plus étudié.



Adapté de Ozaki et al, 2015 (274)

Figure 22. Mécanismes cellulaires d'activation de l'inflammasome NLRP3. Les PAMPs de bactéries ou de virus ou des DAMPs vont agir comme le premier signal de mobilisation en activant le NFκB et l'expression de NLRP3 et de pro-IL-1β (Signal 1). NLRP3 s'oligomérisse et recrute ASC et la procaspase-1 en réponse au signal d'activation (Signal 2). NLRP3 peut être activé en réponse à une concentration de K⁺ intracellulaire basse *via* un efflux de K⁺ au travers du récepteur P2X7-ATP dépendant, en réponse aux ERO relarguées par la mitochondrie endommagée ou en réponse à la sortie de cathepsine B de lysosomes endommagés. L'inflammasome activé induit l'activation de la caspase-1 qui clive les pro-IL-1β et pro-IL-18 en leurs formes matures.

1.2.2.2. Données expérimentales sur la sécheresse oculaire

Les études cliniques sur des patients atteints de sécheresse oculaire, ainsi que les expérimentations animales ou cellulaires utilisant des modèles de sécheresse oculaire, ont permis d'identifier certains mécanismes de la pathologie et d'observer sa composante inflammatoire. Le rôle important de l'hyperosmolarité y est également souligné par les résultats obtenus sur des modèles *in vivo* de sécheresse oculaire qui rapportent presque tous l'apparition d'une hyperosmolarité lacrymale. Le rôle crucial de cette condition dans la pathologie est également appuyé par le fait que l'application de solutions hyperosmolaires, aussi bien *in vivo* que *in vitro*, est un modèle validé de sécheresse, qui est fréquemment utilisé pour étudier celle-ci. Les effets pro-inflammatoires observés dans ces modèles utilisant l'hyperosmolarité, renforcent d'autant plus l'hypothèse du déterminant de celle-ci dans la pathologie.

1.2.2.2.1. Données humaines

1.2.2.2.1.1. Méthodes de prélèvement et techniques d'études

Les études menées sur des patients atteints de sécheresse oculaire utilisent des tests de diagnostic classiques permettant d'observer et quantifier : les symptômes, l'altération de l'intégrité de la surface oculaire, la diminution de la sécrétion lacrymale ou l'instabilité du film lacrymal. Ces tests sont réalisés dans le but de confirmer la situation de sécheresse oculaire dans laquelle se trouvent les patients intégrés dans l'étude et éventuellement pour classer les patients en fonction de la sévérité de leur atteinte. Des sujets "contrôles" sont également enrôlés afin de déterminer les observations liées à la pathologie. Le diagnostic de la sécheresse oculaire étant difficile, les patients présentant souvent une dissociation entre les signes cliniques et les symptômes et aucun marqueur spécifique de la maladie n'étant identifié, il est à noter que les critères d'inclusion peuvent ainsi varier d'une étude à l'autre.

Dans les études cliniques concernant l'observation des phénomènes inflammatoires dans la sécheresse oculaire, l'analyse de la composition des larmes et des cellules de la conjonctive est souvent pratiquée.

La technique de **recueil des larmes** par récupération directe de celles-ci avec une micropipette au niveau de la surface oculaire est la plus fiable mais est également difficile à réaliser, notamment en cas de sécheresse oculaire. Celle-ci doit se faire en évitant une stimulation lacrymale qui biaise alors les résultats par un phénomène mécanique de dilution qui est variable suivant les patients mais également par une modification du profil de protéines lacrymales (275). Le volume des larmes, spécialement dans les cas de sécheresse oculaire, est limité. Il a donc parfois été testé d'autres méthodes de recueil par absorption des larmes sur un collecteur de type papier ou mousse suivie d'une élution des protéines (276), l'utilisation des bandes utilisées lors du test de Schirmer étant la plus rapportée (277). Ces techniques sont cependant sujettes à des éluions ou extractions incomplètes ou non uniformes pouvant aussi biaiser les résultats (278). L'addition d'un faible volume de solution saline physiologique au niveau de la surface oculaire afin d'augmenter le volume lacrymal avant récupération de l'échantillon est parfois avancé comme étant une bonne alternative, malgré la dilution des marqueurs contenus dans les larmes (279,280). L'étude de la composition des larmes peut ensuite se faire par des kits de détection par la technique ELISA simple mais en raison du faible volume de ces échantillons (de 1µL à 50µL), la détection est souvent réalisée par la technique ELISA en multiplex. Les techniques en multiplex permettent de doser sur un même échantillon de multiples marqueurs en même temps. C'est ainsi une technique très adaptée pour la détection et quantification de panels de marqueurs pro-inflammatoires lacrymaux.

Les **cellules conjonctivales** peuvent être récupérées de plusieurs façons. La technique majoritairement utilisée actuellement est le prélèvement des cellules de la couche superficielle de la conjonctive par empreinte conjonctivale (120,281). Dans des études qui sont souvent plus anciennes, il est parfois réalisé des biopsies conjonctivales ou des légers brossages cytologiques de la conjonctive (282) permettant de récupérer ces cellules. L'ensemble de ces techniques permet de recueillir les différentes cellules présentes dans la conjonctive, soit majoritairement des cellules épithéliales conjonctivales mais également des cellules à mucus et des cellules immunitaires. Le fait que cette population ne soit pas unicellulaire est donc à prendre en compte lors de l'analyse des

différents résultats. Ces cellules conjonctivales une fois récupérées peuvent être examinées directement au microscope avec ou sans marquage de protéines particulières ou bien, après dissociation, par cytométrie en flux. Les ARNs ou les protéines de ces échantillons de cellules conjonctivales peuvent également être extraits. Des techniques de détection et quantification de marqueurs particuliers peuvent être alors réalisées par RT-qPCR ou Western Blot. Les marqueurs inflammatoires classiques mais également les différentes mucines, les marqueurs de stress oxydant ou d'apoptose sont fréquemment étudiés par ces techniques de biologie moléculaire.

Notons qu'il existe quelques études sur des patients atteints du SGS pour lesquelles une biopsie des glandes lacrymales a été réalisée et analysée (283,284).

Enfin, de nouvelles **techniques d'imagerie *in vivo*** comme la microscopie confocale *in vivo* utilisant un HRT permettent de visualiser directement chez le patient l'infiltration de la conjonctive et de la cornée par des cellules immunitaires, essentiellement des cellules dendritiques, bien visibles grâce à leurs prolongements ainsi que des polynucléaires et des cellules mononucléées. Ces techniques permettent également d'observer les altérations de la surface oculaire comme la métaplasie squameuse et la perte des cellules à mucus (285).

1.2.2.1.2. Résultats en termes d'inflammation

Les études publiées sur la sécheresse oculaire ont rassemblé de nombreux patients avec des profils parfois très hétérogènes en ce qui concerne l'étiologie de celle-ci. Dans la majorité des études, il était néanmoins renseigné si les patients présentaient une sécheresse oculaire liée à un SGS ou non liée à ce syndrome. Environ la moitié des études ont ainsi été menées spécifiquement sur les patients atteints d'un SGS et les résultats observés en termes d'inflammation ont été les mêmes que ceux des patients ayant une sécheresse simple tout en présentant souvent un profil plus prononcé. Les résultats concernant uniquement les patients spécifiques de SGS seront bien identifiés comme tels dans les paragraphes suivants.

De nombreuses études ont rapporté une augmentation des **cytokines pro-inflammatoires** (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , CCL2 et CCL5) (286–292) dans les larmes des patients atteints de sécheresse. Le taux d'IL-6 a en outre été associé à la sévérité de la maladie et corrélé avec plusieurs paramètres de la surface oculaire et du film lacrymal dans une étude, ce qui n'a pas été le cas avec le TNF- α (286). Les mêmes facteurs pro-inflammatoires ont été trouvés augmentés dans la conjonctive (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α et CCL5) (291,292). Les études sur des patients atteints de SGS ont montré des résultats identiques avec souvent une augmentation plus importantes de ces marqueurs (286,293–298). En raison de l'augmentation observée d'IL-1 β , deux études récentes ont porté plus particulièrement sur l'analyse de l'inflammasome. Elles ont rapporté chez les patients atteints de sécheresse oculaire une augmentation des différents composants de l'inflammasome (NLRP3, ASC et procaspase-1) et de pro-IL-1 β dans la conjonctive couplée à une augmentation d'IL-1 β lacrymale avec des augmentations encore plus prononcées chez les patients présentant un SGS (299,300).

La présence de marqueurs du profil immunitaire **Th1** a également été fréquemment rapportée dans les cas de sécheresse oculaire, avec une augmentation de ses marqueurs ou de ses récepteurs associés dans les larmes (IFN- γ (288,291), CXCL9 (301), CXCL10 (302) et CXCL11 (301)) ou dans la conjonctive (CCR5 (303,304), CXCR3, CXCL9, CXCL10 et CXCL11 (301)). En outre, il a souvent été rapporté l'augmentation de cytokines du système **Th17**, avec une augmentation d'IL-17 et IL-22

(290,305). De la même façon qu'avec les marqueurs inflammatoires classiques, les patients avec un SGS présentent les mêmes profils Th1 et Th17 avec parfois des modifications de marqueurs plus prononcées (290,292,296,297,301,306). Les taux d'IL-17 et d'IL-22 dans les larmes ont par ailleurs été corrélés avec les scores de kératopathies, du temps de rupture du film lacrymal et du test de Schirmer chez les patients présentant une sécheresse liée ou non à un SGS (305). Enfin, il est également observé une augmentation de TGF- β (306) dans les larmes des patients atteints de sécheresse oculaire.

Pour les deux groupes de sécheresse, il a également été observé une **infiltration lymphocytaire** de la conjonctive avec détection d'**ICAM-1** (295,307,308) ainsi qu'une modification des **MMPs** avec l'augmentation de MMP-9 (304,309,310) dans les larmes et la conjonctive, augmentation corrélée aux paramètres cliniques (309). Une étude a mis en évidence que l'augmentation de MMP-9 serait liée à l'augmentation d'une protéine particulière, *extracellular matrix metalloproteinase inducer* (EMMPRIN), également appelée CD147, une glycoprotéine qui stimule la production de nombreuses MMPs (311).

Il a été aussi fréquemment observé une augmentation des **molécules du CMH II et des molécules associées** chez les patients présentant une sécheresse oculaire : HLA-DR (304,307,308,312), CD40 et CD40L (121), augmentation souvent plus importante chez les patients avec un SGS (121,295,298,313). En outre, l'expression de HLA-DR chez des patients atteints de sécheresse légère à modérée est apparue dans une étude comme étant le reflet de la progression de la maladie (312). Enfin, dans le cas de SGS, il a été rapporté une infiltration inflammatoire de cellules T mais également de lymphocytes B dans la conjonctive (314,315). Notons qu'une étude menée sur des patients présentant une sécheresse modérée n'a pas détecté ces différents acteurs de l'inflammation, suggérant que ces différents marqueurs apparaissent lorsque la maladie est déjà à un stade sévère (316).

L'analyse des glandes lacrymales de patients ayant un SGS a rapporté l'apparition d'une infiltration de celles-ci par des cellules B et T ainsi qu'une augmentation des marqueurs pro-inflammatoires VCAM-1, ICAM-1, IFN- γ et IL-1 β (283,284).

Ces travaux ont aussi souvent étudié les **mucines** : il a été ainsi observé une altération de la distribution des mucines et de leur glycosylation à la surface des cellules conjonctivales (317) avec une augmentation de MUC1 dans les larmes (318). Cette altération a été plus étudiée chez les patients atteints de SGS et a montré dans les larmes une augmentation de MUC1 (318) et de MUC16 (319) ainsi qu'une diminution de MUC5AC (320) et dans la conjonctive une augmentation également de MUC1 (318). La diminution caractéristique de la **densité des cellules à mucus** a été fréquemment rapportée dans les deux groupes de sécheresse oculaire (314,315,321,322). Enfin, des dommages tissulaires ont permis également de déterminer la présence d'un **potentiel oxydant** dans le film lacrymal des patients souffrant de sécheresse oculaire (323) et de détecter la présence d'EROs dans leur conjonctive (299). Notons également que ces études cliniques ont fréquemment rapporté la présence d'une **métaplasie squameuse** dans la conjonctive des patients atteints (315,324–326).

L'ensemble de ces nombreuses études a donc bien montré la composante inflammatoire de la sécheresse oculaire par la détection de plusieurs marqueurs pro-inflammatoires chez les patients atteints, toutes étiologies confondues. Ces études ont également permis de détecter la présence de profils immunitaires favorisés dans cette pathologie, les profils Th1 et Th17. Il est ainsi maintenant

communément admis que ce sont ces deux profils de lymphocytes qui sont stimulés dans la sécheresse oculaire. Les données expérimentales vont confirmer ces observations.

1.2.2.1.2. Données expérimentales des modèles de sécheresse oculaire

Les expérimentations *in vivo* et *in vitro* sur la sécheresse oculaire ont analysé les effets pro-inflammatoires de cette pathologie et notamment ceux induits par l'hyperosmolarité. Ces études expérimentales permettent également d'étudier plus profondément la physiopathologie de la maladie ainsi que ces mécanismes sous-jacents. Dans ce but, elles ont souvent été couplées à l'étude de voies intracellulaires classiques afin de déterminer l'éventuel rôle de celles-ci dans cette maladie. Les voies majoritairement étudiées sont la voie des MAPKs et la voie liée au facteur de transcription NFκB qui sont souvent observées comme stimulées dans ces modèles.

1.2.2.1.2.1. Modèles animaux *in vivo*

1.2.2.1.2.1.1. Les différents types de modèles animaux

Il existe de nombreux modèles *in vivo* de sécheresse oculaire qui ont été étudiés chez différentes espèces animales (souris, rat, lapin, singe, chien) (327). Ces modèles permettent de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie et permettent aussi de tester l'efficacité et l'innocuité des molécules thérapeutiques. L'ensemble de ces modèles animaux induit au niveau de la surface oculaire les caractéristiques d'une sécheresse oculaire avec une diminution de la sécrétion lacrymale accompagnée d'une altération des épithéliums conjonctivaux et cornéens et souvent une perte des cellules à mucus. De nombreux phénomènes inflammatoires ont également été observés dans ces modèles et seront détaillés plus loin.

1.2.2.1.2.1.1.1. Modèles chimiques entraînant une hyposécrétion lacrymale

Les modèles chimiques responsables d'une hyposécrétion lacrymale sont basés sur l'administration d'une molécule qui va inhiber la sécrétion lacrymale au travers d'une altération des arcs réflexes nerveux reliant la glande lacrymale à la surface oculaire. Il existe différents types de molécules qui peuvent être administrées par instillation locale, par voie transcutanée ou par injection soit sous-cutanée, soit directement dans les glandes lacrymales ou dans les glandes de Meibomius.

- L'**atropine**, un anticholinergique antagoniste des récepteurs muscariniques, en instillation locale quotidienne, induit des caractéristiques de sécheresse oculaire accompagnées d'une métaplasie conjonctivale (328–330).
- La **scopolamine**, une molécule parasympholytique anticholinergique qui inhibe les récepteurs muscariniques, est fréquemment utilisée par voie transcutanée ou sous-cutanée réitérée (331–333). Ce modèle présente, en plus des caractéristiques classiques de la sécheresse oculaire, une diminution du marquage MU5AC dans la conjonctive et une modification de la composition en acide gras de la glande lacrymale (334). Il est souvent couplé à une exposition à un flux d'air en continu, rajoutant ainsi un stress dessiccatif physique.
- La **toxine botulique B** peut également être utilisée, en injection unique dans les glandes lacrymales, car elle bloque la libération d'acétylcholine au niveau du système parasympholytique (335).

- Enfin, l'injection de **concanavaline A**, un composé pro-inflammatoire et mitogène de lymphocytes T, dans la glande lacrymale a aussi été utilisée comme modèle d'œil sec.

1.2.2.1.2.1.1.2. Modèles physiques entraînant une hyposécrétion lacrymale

Les modèles par hyposécrétion lacrymale d'origine physique sont obtenus après un geste chirurgical consistant en une ablation ou une dénervation des glandes lacrymales ou des glandes de Meibomius.

Les modèles par **cautérisation du canal excréteur lacrymal** ou **des glandes de Meibomius** induisent chacun des signes classiques de sécheresse couplés à une hyperosmolarité lacrymale (336–339). L'**ablation des glandes lacrymales** a également été utilisée dans de nombreuses études sur différentes espèces, couplée parfois à l'excision de la membrane nictitante (une sorte de troisième paupière) et de la glande de Harder, deux structures présentes chez certains vertébrés, et conduisent à une sécheresse oculaire avec une métaplasie conjonctivale (340–344).

Les modèles par **dénervation** ont pour but d'induire une kératite neurotrophique. Les animaux traités présentent une sécheresse oculaire couplée à une augmentation de l'osmolarité lacrymale (345). Il est rapporté la dénervation parasymphatique préganglionnaire (346,347) ou la dénervation de la cornée, par destruction de la branche ophtalmique du nerf trijumeau. Cette dernière technique conduit à une kératite neurotrophique avec des phénomènes d'apoptose qui seraient surtout liés à la perte de la sensibilité au niveau de la surface cornéenne plus qu'à l'absence du clignement de paupières qui en découle (348,349).

Un type particulier de souris, les souris **déficientes en neurturine**, un facteur neurotrophique des neurones parasymphatiques, est proche de ces modèles car ces souris présentent un défaut d'innervation parasymphatique de leurs glandes lacrymales qui entraîne des signes classiques de sécheresse oculaire avec augmentation de la perméabilité cornéenne et une diminution de l'expression de mucines (350).

1.2.2.1.2.1.1.3. Modèles expérimentaux par excès d'évaporation

Un des modèles les plus fréquemment utilisés de sécheresse oculaire est le modèle par excès d'évaporation induit par un **stress dessiccatif**. Il nécessite le placement des animaux dans une chambre à environnement contrôlé dans laquelle un flux d'air continu est appliqué, associé à un taux d'humidité dans l'environnement très faible. Ce modèle induit une sécheresse oculaire accompagnée de phénomènes d'apoptose et d'apparition d'EROs ainsi qu'une métaplasie squameuse de l'épithélium de la surface (333,351–355) et un épaissement de l'épithélium cornéen (356). Ce modèle est fréquemment utilisé couplé à l'administration de scopolamine afin d'augmenter la sécheresse de la surface oculaire, et s'accompagne alors d'une altération du meibum sécrété (357). Des dérivés de ce modèle ont également été utilisés, comme la combinaison d'un effort continu tel le maintien sur une table basculante couplé à un flux d'air. Ceci induit des signes classiques de sécheresse avec altération de la fonction lacrymale et diminution de la fréquence des clignements palpébraux avec apparition de stress oxydant dans l'épithélium cornéen (358,359).

Il existe également les modèles par **maintien des paupières ouvertes** à l'aide d'un spéculum ou d'un agent adhésif qui induit une sécheresse de la surface oculaire en quelques heures (360–362), le clignement des paupières étant important pour une bonne répartition du film lipidique.

L'**instillation topique de BAK** pendant plusieurs jours, voire semaines a été très utilisée comme modèle de sécheresse. Par ses propriétés détergentes, le BAK altère la couche lipidique du film lacrymal et entraîne un excès d'évaporation de celui-ci. Les animaux traités présentent les caractéristiques d'une sécheresse oculaire avec également une diminution du taux de MUC5AC et une métaplasie squameuse conjonctivale (80,363–366). Cependant, ce modèle est actuellement sujet à controverse car considéré comme trop drastique et correspondant plus à un modèle de brûlure chimique que de sécheresse oculaire. De même, l'instillation d'**acide trichloracétique dilué**, parfois associée à l'excision de la glande lacrymale, de la membrane nictitante et de la glande de Harder, induit également des signes de sécheresse ainsi qu'une métaplasie conjonctivale, mais a été peu utilisée (342,367).

1.2.2.1.2.1.1.4. Modèles expérimentaux par instillation hyperosmolaire

Le modèle hyperosmolaire le plus fréquemment utilisé est le modèle par instillation de **solution hyperosmolaire saline** qui induit des caractéristiques de sécheresse oculaire avec également instabilité du film lacrymal, diminution de l'expression de la protéine MUC5AC et apparition de phénomènes d'apoptose (368,369). Il existe également un modèle hyperosmolaire très aigu par application de **sucrose** sur la cornée qui induit une déshydratation massive et rapide du film lacrymal conduisant à une altération cornéenne dès 2 minutes d'application, et ce pendant 6 heures, avec apparition de signes d'apoptose mais sans phénomènes inflammatoires (370).

1.2.2.1.2.1.1.5. Modèles de sécheresse oculaire auto-immune

Il existe plusieurs modèles murins spécifiques à l'étude de la sécheresse oculaire liée au SGS. Une des souches de souris les plus étudiées est la souris **NOD (non-obese diabetic)** qui développe une maladie auto-immune et présente des lésions inflammatoires des glandes lacrymales avec infiltration immunitaire, une diminution de la sécrétion lacrymale et des phénomènes d'apoptose (371). Une augmentation de la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire avec une importante désorganisation structurale de celle-ci dans les glandes lacrymales ont également été observées (372). Ce type de souris a parfois été soumis à un stress dessiccateur pour rendre le modèle plus drastique (373). Les souris **Aire-KO (autoimmune regulator-knockout)** sont également fréquemment utilisées comme modèle de SGS et présentent en outre une métaplasie squameuse de la surface oculaire (374,375). Il existe aussi les **souris MRL/lrp** ou **MRL/+** qui montrent une auto-immunité systémique ou les souris **déficientes en thrombospondin-1** qui développent une pathologie de la surface oculaire chronique, caractérisée par une détérioration et un dysfonctionnement de la glande lacrymale présentant en plus des phénomènes d'apoptose (376,377). D'autres types de souris transgéniques ont été utilisées comme des souris ayant une **régulation déficiente de NF- κ B** induisant un SGS (378,379), les souris **CD25 KO** (380) ou les souris **déficientes en TGF- β 1** (381).

1.2.2.1.2.1.1.6. Autres modèles de sécheresse oculaire

D'autres modèle de sécheresse oculaire existent, notamment la **sécheresse oculaire spontanée du chien** (382).

Il existe d'autres modèles utilisés moins fréquemment. Citons parmi eux : des souris transgéniques présentant une altération des mécanismes antioxydants ou une production accrue de stress oxydant qui conduisent à des signes de sécheresse oculaire (383,384), et les souris Spdef (-/-). Spdef étant un facteur de transcription nécessaire à la différenciation des cellules à mucus, ces souris présentent une diminution des cellules à mucus accompagnée de signes de sécheresse oculaire.

1.2.2.1.2.1.2. Résultats des modèles animaux sur l'inflammation

L'analyse de la surface oculaire, conjonctive et cornée, des larmes, de la glande lacrymale et des ganglions lymphatiques de drainage dans ces différents modèles de sécheresse oculaire a permis la détection de nombreux marqueurs d'inflammation, récapitulés dans le tableau 4.

L'ensemble des modèles *in vivo* de sécheresse oculaire a rapporté, aussi bien au niveau de la surface oculaire (conjonctive ou cornée) que dans les larmes et dans les glandes lacrymales, une augmentation des **cytokines pro-inflammatoires** IL-1 β , TNF- α , IL-8 ou IL-6. La cytokine IL-1 β a été particulièrement analysée dans ces modèles expérimentaux de la pathologie. L'utilisation de souris KO au récepteur de l'IL-1 (IL-1R1) a permis de déterminer que IL-1 β était en partie responsable de l'augmentation d'expression des cytokines IL-1 α , IL-1 β , TNF- α et IL-8 dans la surface oculaire dans un modèle de stress dessiccateur couplé à de la scopolamine (385), et de l'apparition de phénomènes de métaplasie squameuse de la surface oculaire dans un modèle auto-immun de sécheresse oculaire (375,386). En outre, l'importance de cette chimiokine a été démontrée au cours d'une autre étude *in vivo* qui a rapporté une amélioration des signes cliniques de sécheresse oculaire après traitement local des animaux avec un antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1Ra) (387). En outre, une étude dans un modèle de stress dessiccateur a observé dans la cornée, couplée à l'induction d'IL-1 β , une augmentation des différents composants de l'inflammasome NLRP3, ASC et caspase-1, une augmentation qui serait liée au stress oxydant généré par le modèle (355). Notons également qu'une autre étude sur un modèle de stress dessiccateur physique a permis d'observer une élévation tardive de l'autre cytokine produite par la voie de l'inflammasome, l'IL-18, dans la conjonctive (388).

Cette inflammation est accompagnée d'une induction de plusieurs **MMPs**, la plus fréquemment détectée étant MMP-9. Le rôle particulier de MMP-9 dans le développement de la sécheresse oculaire a été démontré dans deux études particulières *in vivo*. La première, par Pflugfelder *et al.*, réalisée avec des souris KO pour MMP-9, a montré le rôle de cette MMP dans l'induction de la perméabilité cornéenne associée à la pathologie (389). La deuxième étude, par Aluri *et al.*, renforce l'hypothèse du rôle délétère de MMP-9 en lui attribuant un rôle dans l'inhibition lacrymale. En effet, l'application d'un inhibiteur de MMP2/9 dans un modèle de sécheresse oculaire spécifique du SGS a conduit à une amélioration de la production de larmes ainsi qu'à une diminution des foyers lymphocytaires dans la glande lacrymale (390). Les **molécules d'adhésion** ICAM-1 et VCAM-1 sont également augmentées dans les glandes lacrymales ou la surface oculaire des modèles spécifiques du SGS. Enfin, une étude a également rapporté une augmentation des **molécules du CMH II** dans la surface oculaire dans un modèle par stress dessiccateur couplé à de la scopolamine (391).

	Surface oculaire (cornée ou conjonctive)	Larmes ou liquide de lavage oculaire	Glande lacrymale	Ganglions lymphatiques de drainage ou régionaux	Références
Modèles par hyposécrétion chimique	<ul style="list-style-type: none"> . Augmentation des marqueurs : <ul style="list-style-type: none"> - pro-inflammatoires (IL-1β, TNF-α, IL-8, IL-6) - Th1 (IFN-γ, IL-2) - Th17 (IL-17, IL-23) . Augmentation de TGF-β . Augmentation des MMPs (MMP-9) . Infiltration de cellules inflammatoires 	<ul style="list-style-type: none"> . Augmentation des marqueurs : <ul style="list-style-type: none"> - pro-inflammatoires (IL-1β, TNF-α) 	<ul style="list-style-type: none"> . Augmentation des marqueurs : <ul style="list-style-type: none"> - pro inflammatoires (IL-1β, TNF-α, IL-6) - Th1 (IL-2, IFN-γ, IL-12IL-12R) - Th17 (IL-17) . Augmentation de TGF-β . Infiltration de cellules inflammatoires 		(330,334,392-400)
Modèles par ablation des grandes lacrymale et assimilés	<ul style="list-style-type: none"> . Augmentation des marqueurs : <ul style="list-style-type: none"> - pro-inflammatoires (IL-1β, TNF-α) . Augmentation des MMPs (MMP-9) . Augmentation des Th17 	<ul style="list-style-type: none"> . Augmentation des marqueurs : <ul style="list-style-type: none"> - pro-inflammatoires (IL-1β) . Augmentation des MMPs (MMP-9) 		<ul style="list-style-type: none"> . Augmentation des Th17 	(350,401)
Modèles par stress dessiccatif physique simple ou par maintien des paupières ouvertes	<ul style="list-style-type: none"> . Augmentation des marqueurs : <ul style="list-style-type: none"> - pro-inflammatoires (IL-1β, TNF-α et IL-6) - Th1 (IFN-γ) - Th17 (IL-17, IL-23) . Augmentation de TGF-β . Infiltration de cellules immunitaires 			<ul style="list-style-type: none"> . Augmentation de l'activité des Th17 . Dysfonctionnement des Treg 	(333,355,361,397)
Modèle par stress dessiccatif physique + scopolamine	<ul style="list-style-type: none"> . Augmentation des marqueurs : <ul style="list-style-type: none"> - pro-inflammatoires (IL-1α, TNF-α, IL-1β, IL-8, IL-6) - Th1 (IFN-γ, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCR3) - Th17 (IL-17, IL-23, IL-23R et IL-17R, CCR6) . Augmentation de TGF-β . Augmentation de l'expression du CMH II . Augmentation des MMPs (MMP-1, MMP-9, MMP-3, MMP-9, MMP-13 et MMP-10) . Infiltration de cellules immunitaires dont les NK 	<ul style="list-style-type: none"> . Augmentation des marqueurs : <ul style="list-style-type: none"> - pro-inflammatoires (IL-1β) - Th1 (IFN-γ) - Th17 (IL-17) . Augmentation des MMPs (MMP-1, MMP-3, MMP-9) 		<ul style="list-style-type: none"> . Augmentation des marqueurs : <ul style="list-style-type: none"> - pro-inflammatoires (IL-6) - Th17 (IL-17, cellules exprimant CCR6) - Th1 (IFN-γ, IL12R; cellules exprimant CXCR3, CCR5) - de Treg dysfonctionnels . Augmentation de cellules NK sécrétrice d'IFN-γ . Cellules T exprimant CD40L 	(385,391,402-413)
Modèle BAK	<ul style="list-style-type: none"> . Augmentation des marqueurs : <ul style="list-style-type: none"> - pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1β, IL-6) . Augmentation des MMPs (MMP-9) . Infiltration inflammatoire 				(81,366,414)
Modèle hyperosmolaire	<ul style="list-style-type: none"> . Augmentation des marqueurs : <ul style="list-style-type: none"> - pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1β) . Infiltration de cellules inflammatoires 	<ul style="list-style-type: none"> . Augmentation des marqueurs : <ul style="list-style-type: none"> - pro-inflammatoires (IL-1β) 			(415)
Modèles spécifiques de Gougerot-Sjögren couplés ou non à un stress dessiccatif physique	<ul style="list-style-type: none"> . Augmentation des marqueurs : <ul style="list-style-type: none"> - pro-inflammatoires (TNF-α, IL-6, CCL2) - Th1 (IFN-γ, cellules CD4+ et CCR5+) . Augmentation des molécules d'adhésion (ICAM-1) - Th17 (IL-17) . Augmentation des MMPs (MMP-9) . Infiltration de cellules T CD4+ ; diminution de CD8+ 		<ul style="list-style-type: none"> . Augmentation des marqueurs : <ul style="list-style-type: none"> - Th1 (IFN-γ, IL-2, IL-12, cellule CD4+ et CCR5+) - Th17 (IL17, IL-23R) . Augmentation de TGF-β . Augmentation des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) . Augmentation des MMPs (MMP-2, MMP-9) . Infiltration de lymphocyte avec une diminution de CD8+ 	<ul style="list-style-type: none"> . Augmentation des marqueurs : <ul style="list-style-type: none"> - pro-inflammatoires (IL-6, TNF-α) - Th17 (IL-17) - Th1 (IFN-γ) 	(373,376,377,380,396,416-419)

Tableau 4. Tableau récapitulant les marqueurs inflammatoires détectés lors d'expérimentations *in vivo* de sécheresse oculaire.

Parallèlement à l'augmentation de ces médiateurs moléculaires de l'inflammation, il est rapporté une augmentation des médiateurs cellulaires de l'inflammation avec notamment une **infiltration de cellules immunitaires inflammatoires** dans l'épithélium conjonctival et l'épithélium cornéen ainsi que dans les glandes lacrymales. La quasi-totalité des nombreuses observations rapportées démontrent l'apparition de réponses immunitaires de type Th1 et Th17, comme dans les études menées sur les patients.

Les marqueurs associés au **Th1**, majoritairement IFN- γ mais également IL-2, sont augmentés dans la surface oculaire, les larmes et les glandes lacrymales de plusieurs modèles de sécheresse oculaire. Une infiltration de cellules positives à IFN- γ a été observée dans la conjonctive et a montré que celle-ci jouait un rôle dans l'apparition de métaplasie squameuse conjonctivale (404). L'importance de cette cytokine signature du type Th1 a été relayée par d'autres études montrant qu'une neutralisation d'IFN- γ améliorait la densité de cellules à mucus et l'état de la surface oculaire qui sont altérés dans ces modèles animaux de sécheresse oculaire (412,420). En outre, il a été observé que l'induction de marqueurs associés au Th1 (CXCL9, CXCL10, CXCL11) dans la conjonctive était dépendante de IFN- γ (408). Notons également que cette cytokine a été identifiée comme ayant un rôle pivot dans l'apoptose des cellules épithéliales cornéennes et conjonctivales observé dans un modèle *in vivo* de sécheresse oculaire en exacerbant celle-ci (421,422).

Les marqueurs associés au **Th17** (IL-17 et IL-23 en majorité) sont également augmentés au niveau de la surface oculaire et dans les larmes des animaux soumis aux différents modèles de sécheresse oculaire. L'importance d'IL-17 a été rapportée par une étude utilisant des anticorps neutralisants d'IL-17 dans un modèle expérimental de sécheresse oculaire : ces animaux ont présenté une diminution du dysfonctionnement de la barrière cornéenne et de l'expression des MMPs (407).

Le TGF- β est également augmenté dans la conjonctive et les larmes de ces modèles *in vivo* de sécheresse oculaire. Le rôle du TGF- β dans l'induction des voies Th1 et Th17 et de certains signes cliniques a été rapporté *via* une étude utilisant des souris non répondeuses au TGF- β soumises à un stress dessiccatif (423). Ces souris ont développé des signes de sécheresse moins importants notamment concernant l'induction des cytokines Th1 et Th17. Cela suggère ainsi que le TGF- β aurait un rôle critique dans la réponse immunitaire et le phénotype oculaire induit par un stress dessiccatif.

Enfin, l'analyse des ganglions lymphatiques drainants a été réalisée dans certaines études et confirme l'inflammation par l'induction de la voie Th17 et Th1 associant également un dysfonctionnement des **Treg** (333). Dans un modèle de sécheresse oculaire *in vivo*, une infiltration de **cellules NK** dans la conjonctive couplée à une augmentation des cellules NK sécrétrices d'IFN- γ dans les ganglions lymphatiques de drainage a pu être mise en évidence (412).

L'implication des voies Th1 et Th17 dans la pathologie est donc confirmée par les modèles expérimentaux de sécheresse oculaire. Cela a été rapporté en outre par une étude utilisant des souris KO pour CCR6 (un récepteur impliqué dans la voie Th17) ou pour CXCR3 (un récepteur impliqué dans la voie Th1), soumises à un modèle de sécheresse oculaire, qui présentaient alors des signes de sécheresse diminués avec moins de perte de cellules à mucus, moins d'infiltration de lymphocytes au niveau de la surface oculaire et une amélioration de la barrière cornéenne (413). L'importance des cellules T CD4+ est également démontrée chez des animaux déficients en cellules T

recevant des cellules T CD4+ d'animaux soumis au préalable à un stress dessiccatif. Ceux-ci développent une inflammation au niveau de la surface oculaire et des glandes lacrymale équivalente à celle observée chez les souris en stress dessiccatif. En outre, cette inflammation est exacerbée chez des animaux déficients en Treg, suggérant un rôle modérateur de l'inflammation de ce type cellulaire (424).

Quelques études *in vivo* ont obtenu des résultats contradictoires par rapport à cette implication des profils Th1 et Th17. Ainsi, une étude sur un modèle de sécheresse par injection de scopolamine a rapporté une atténuation de l'activité Th17 couplée à une augmentation des réponses Th2 et Treg dans les ganglions lymphatiques de drainage (333). Une autre étude utilisant un modèle de stress dessiccatif physique couplé à l'administration de scopolamine a rapporté l'induction d'IL-10, une cytokine associée au profil Th2, sur la surface oculaire (391). Chez des souris MRL/lpr et MRL/+, modèles de SGS, il a aussi été rapporté un profil Th2 dans les glandes lacrymales, avec une augmentation d'IL-4 et IL-10 (425,426).

Certaines études ont également démontré que, en appliquant un modèle de sécheresse oculaire sur deux souches de souris différentes, une souche, C57BL/6, présentait une réponse Th1 alors que l'autre souche, BALB/c, une réponse Th2 (427,428). Des divergences suivant ces souches de souris ont été également observées concernant l'induction des MMPs (410) ou les caractéristiques mêmes de sécheresse oculaire engendrées (429). Cela pourrait s'expliquer par une différence dans le nombre et la sensibilité des cellules Treg CD4+ CD25+ entre ces deux souches de souris (430). Ces différences concernant les réponses immunitaires de ces deux souches sont rapportées par d'autres expériences dans d'autres modèles pathologiques (431), la souche C57BL/6 favorisant toujours une réponse de type Th1, et BALB/c une réponse de type Th2 (432–434). Pour finir, concernant l'hyperosmolarité lacrymale induite par un modèle de stress dessiccatif couplé à une administration de scopolamine, une étude a rapporté des résultats similaires entre ces deux souches (435).

Ces résultats contradictoires rappellent que les modèles *in vivo* ont leurs limites qui sont à prendre en compte lors de l'analyse des résultats obtenus et avant toute extrapolation à l'homme. Les modèles *in vivo* restent néanmoins des outils très efficaces pour identifier les acteurs potentiels de la pathologie et comprendre les mécanismes sous-jacents de celle-ci, mais ne dispensent pas de la collecte et de l'analyse de données humaines.

Dans le but de comprendre les mécanismes intracellulaires mis en jeu lors de la sécheresse oculaire, les voies cellulaires stimulées par l'application de ces modèles ont été également étudiées et les résultats ont permis d'identifier la participation des voies **MAPKs** et du facteur de transcription **NFκB**. En effet, le modèle par stress dessiccatif physique couplé à l'administration de scopolamine ainsi que le modèle hyperosmolaire ont conduit à l'augmentation de l'activité des MAPKs dans les épithéliums conjonctival et cornéen (403,415). En outre, il a été montré que l'augmentation des MMPs observée dans les modèles de sécheresse oculaire serait liée à l'activité d'une MAPK spécifique : JNK et que celle-ci régulerait également le développement de la métaplasie squameuse (409). Par ailleurs, p38 aurait également un rôle important dans la pathologie, puisque l'injection d'un inhibiteur de cette voie, SB203580, dans les glandes lacrymales améliore la stabilité lacrymale et la surface oculaire de souris MRL/lpr, un modèle *in vivo* de SGS (436). Le rôle de NFκB a quant à lui

été observé dans le modèle BAK, ce modèle induisant sur la surface cornéenne une activation de la voie NFκB (81,366,414).

Bien que peu rapportée dans ces modèles *in vivo* de sécheresse oculaire, l'importance particulière de la chimiokine CCL2 dans la pathologie a été démontrée par une étude de Goyal *et al.* Cette étude observe une amélioration des symptômes de sécheresse oculaire et des marqueurs biologiques pro-inflammatoires chez des animaux soumis à un modèle de sécheresse oculaire et traités par l'application topique d'un antagoniste de CCR2, le récepteur de CCL2 (437). Cette chimiokine a également été observée comme augmentée dans la cornée d'un modèle murin du SGS (376).

1.2.2.1.2.2. Modèles *in vitro*

Les modèles *in vivo* sont indispensables à l'étude de la maladie mais sont onéreux et souffrent parfois d'un manque de reproductibilité car les conditions d'expérimentation sont difficiles à standardiser. Des modèles *in vitro* sur des cellules de la surface oculaire sont alors développés afin de déterminer le comportement de ces cellules dans un environnement de sécheresse oculaire. L'utilisation de ce type de modèle s'inscrit dans les recommandations de la directive 2010/63/UE du parlement européen et du conseil de l'Europe visant à diminuer les expérimentations animales. C'est la réglementation appelée des "3R" pour : réduire, raffiner et remplacer les modèles animaux lorsque cela est possible. Dans le cadre de la sécheresse oculaire ces modèles sont appliqués majoritairement sur des cellules cornéennes et plus rarement sur des cellules limbiques ou conjonctivales. Ces cellules proviennent le plus souvent de cellules en lignée continue mais peuvent parfois provenir de cultures primaires, et elles peuvent être d'origine humaine ou animale. La majorité des études ont cependant été menées sur des cellules humaines, c'est le cas dans les études citées ci-dessous sauf si explicitement signifié, le peu d'étude sur les cellules animales rapportant le plus souvent les mêmes observations que celles menées sur les cellules humaines (438,439).

Le **modèle hyperosmolaire** par ajout de différents composés osmotiquement actifs tels que le chlorure de sodium, le plus fréquent, le glucose, le mannitol ou le sorbitol, est le modèle le plus décrit. Son but est de mimer l'environnement au contact duquel les cellules de la surface oculaire se trouvent dans les cas de sécheresse oculaire. C'est le même principe que lorsqu'on applique des solutions hyperosmolaires chez les animaux dans le modèle expérimental *in vivo*. Les études de viabilité cellulaire menées sur les cellules de la surface oculaire ont démontré que les conditions hyperosmolaires induisaient une mortalité cellulaire et des phénomènes d'apoptose avec augmentation des caspases 8, 9 et 3/7, une perte d'intégrité de l'ADN, une augmentation du relargage de cytochrome c et une dépolarisation mitochondriale (172,222,440–444). Les études du stress oxydant généré ont été menées sur des cellules cornéennes et ont rapporté l'augmentation de ce type de stress sous hyperosmolarité avec une production d'EROs et une inhibition des enzymes anti-oxydantes (165,299,445). Une étude sur des cellules cornéennes de lapin a démontré que l'hyperosmolarité induisait aussi sur ces cellules une production d'EROs qui conduisait ensuite à l'activation de la voie JNK ce qui déclenchait l'expression de NFκB, induisant à son tour la génération des facteurs inflammatoires IL-1β et TNF-α (438). Les études spécifiques de l'inflammation, également menées sur des cellules cornéennes, ont rapporté l'induction de nombreuses cytokines pro-inflammatoires sous ces conditions : IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8 et CCL2 (248,250,251,299,446). Une

étude menée sur des cellules cornéennes a démontré, en plus de la production d'IL-1 β sous hyperosmolarité, l'augmentation des différents composants de l'inflammasome (NLRP3, ASC, pro-caspase-1, pro-IL-1 β) et a relié ces inductions à la production d'EROs (299). Il a également été observé sur les cellules cornéennes une activation de nombreuses MMPs : MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 (440,447,448). Il a été observé dans une autre étude que cette induction de MMP-9 sous hyperosmolarité dans ces cellules serait liée à EMMPRIN, également augmenté dans ce modèle (311). L'activation des voies des MAPKs (p38, JNK et ERK) et du facteur de transcription NF κ B sous hyperosmolarité ainsi que leur rôle dans les conséquences de ce modèle, comme la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, a également été souvent rapportée dans les cellules cornéennes (179,251,449–451). Des études sur des cellules limbiques ont également démontré que l'hyperosmolarité induisait les cytokines et chimiokines IL-1 β , TNF- α et IL-8 tout en démontrant l'implication des MAPKs et de NF κ B dans cette induction, et, concernant la sécrétion d'IL-1 β et TNF- α , l'implication également de NFAT5 (221,235). Notons que l'hyperosmolarité stimule l'activité d'un autre facteur de transcription *activator protein-1* (AP-1) et de la *Polo-like Kinase 3* (Plk3), une protéine impliquée dans divers processus cellulaires comme la réponse aux dommages de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose, dans les cellules cornéennes (250,251,444). Ces cellules présentent aussi dans ces conditions une augmentation des marqueurs de métaplasie squameuse, *small proline-rich protein 1B* (SPRR1B) et *small proline-rich protein 2A* (SPRR2A) (449).

Les cellules conjonctivales ont été moins étudiées en termes de phénomènes inflammatoires induits par l'hyperosmolarité ; il a néanmoins été rapporté la sécrétion d'un marqueur inflammatoire sous cette condition, IL-6 (86), et l'augmentation de l'expression de HLA-DR (452). L'augmentation de l'activité de JNK a également été rapportée dans une de ces études. Notons pour finir qu'une étude sur des cellules cornéennes et conjonctivales a rapporté que le stress hyperosmolaire induisait une modulation des récepteurs TLR dans ces cellules (453).

Un modèle de **stress dessiccatif** par simple aspiration du milieu de culture a été testé sur des cellules conjonctivales et cornéennes et a conduit à une mortalité cellulaire ainsi qu'à l'augmentation des marqueurs pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 sans avoir d'effet concernant TNF- α et IFN- γ (361,454).

Les modèles par **application de conditions inflammatoires** ont été souvent utilisés. Ils consistent en l'application, dans le milieu de culture de cellules de la surface oculaire, de cytokines pro-inflammatoires ou de cytokines liés à la réponse Th1 ou Th17, des cytokines associées à la sécheresse oculaire. Les cytokines utilisées sont : IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-17 ou TGF- β . Plusieurs études ont rapporté une augmentation de l'expression de HLA-DR et de ICAM-1 par des cellules conjonctivales en présence d'IFN- γ ou de TNF- α (455–457). Cependant, dans le cadre de la sécheresse oculaire, ces études ont rarement pour but d'étudier l'inflammation du fait de la nature même du modèle. Notons qu'il existe certaines études ne s'appliquant pas directement à l'étude de la sécheresse oculaire, qui ont effectué un criblage des réponses des cellules de la surface oculaire en présence de certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-1 α , TNF- α , IFN- γ) en termes d'expression génique ou de sécrétion de cytokines ou chimiokines. Elles ont rapporté l'induction des marqueurs de l'inflammation classiques cités plus haut ainsi que l'induction d'ICAM-1 et de CXCL2 entre autres (458–461). Dans le cadre de la sécheresse oculaire, les études utilisant l'application de conditions d'inflammation sont plutôt destinées à tester des thérapies (462,463) et à étudier d'autres phénomènes comme l'effet sur l'expression des mucines (464–466) ou sur l'expression de certains récepteurs de surface tels que les TLRs (453). Il a également été montré sur des cellules cornéennes

que TGF- β 1 induisait l'augmentation de l'expression et de l'activité de plusieurs MMPs (MMP-9, -1, -13, -3, -10 et -11) (467) et que la combinaison d'IFN- γ et TNF- α sur des cellules cornéennes de lapin induisait une augmentation de la production de MMP-9 en partie sous la dépendance de JNK, p38 et NF κ B (468). En outre, IL-1 β a été capable de provoquer la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires CCL2, IL-6 et IL-8, l'activation de p38 et JNK ainsi que l'activité de NF κ B et AP-1 sur des cellules cornéennes (250). Sur ce type cellulaire, IL-1 β et IFN- γ augmentent par ailleurs l'expression du marqueur de métaplasie squameuse SPRR1B, via la voie p38 (469). Une autre étude a démontré la mort par apoptose des cellules à mucus de souris en présence des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IFN- γ (470).

L'utilisation d'un **modèle 3D de cornée** (SkinEthic®) a été aussi mise en place pour étudier la sécheresse oculaire. Il consiste en la culture de cellules humaines cornéennes en lignée sur un filtre inerte et en interface air-liquide. Cela permet l'obtention d'une construction 3D montrant une organisation cellulaire stratifiée. Cette structure a été placée en conditions de sécheresse (humidité relative basse, température élevée). Les caractéristiques histologiques de sécheresse ont été alors observées couplées à une diminution de la viabilité cellulaire, une augmentation de MUC4 et des marqueurs inflammatoires TNF- α et MMP-9 dans les cellules cornéennes (471).

Il existe également quelques études *ex vivo* utilisant des modèles de sécheresse. Des études ont été menées en cultivant des explants humains en interface air-liquide. L'une d'elles utilisant des implants conjonctivaux a rapporté une stratification épithéliale avec métaplasie squameuse accompagnée de phénomènes d'apoptose ainsi que la présence d'IL-1 β , TNF- α et de MMP-9 dans le milieu de culture (472). Une autre menée sur explants limbiques a démontré l'apparition également d'une métaplasie et l'activation de p38 dans ce modèle de sécheresse (473).

Plusieurs études ont également été menées sur des yeux frais de porc maintenus ouverts dans l'atmosphère ambiante ou dans une atmosphère climatisée et ont rapporté le développement de caractéristiques de sécheresse, avec une altération de la surface oculaire et une mortalité des cellules cornéennes (474–476). Ce modèle a également été amélioré avec l'addition d'un système permettant de simuler si besoin un clignement de paupière et une sécrétion lacrymale (477,478).

L'ensemble des données publiées rapporte ainsi l'importance de l'inflammation dans la sécheresse oculaire avec l'augmentation de nombreux et divers marqueurs pro-inflammatoires couplée à l'apparition d'une réponse immunitaire de type Th1 et de type Th17. L'hyperosmolarité appliquée seule est capable d'engendrer les marqueurs classiques de l'inflammation tels que les cytokines/chimiokines pro-inflammatoires dans les modèles *in vivo* et *in vitro*, ce qui laisse supposer que la présence de ces marqueurs observés chez les patients atteints pourrait être directement due à l'hyperosmolarité lacrymale présente au niveau de la surface oculaire.

1.2.2.3. Thérapeutiques anti-inflammatoires

Depuis la découverte et la reconnaissance du rôle de l'inflammation dans la sécheresse oculaire grâce aux études cliniques et expérimentales, plusieurs nouveaux traitements ont été utilisés dans le but d'inhiber les voies inflammatoires (479,480). La CsA en topique est actuellement très utilisée pour traiter la sécheresse oculaire car elle présente des propriétés anti-inflammatoires. Les glucocorticoïdes par voie ophtalmique sont parfois utilisés en cure courte en début de traitement

par la CsA afin d'accélérer l'apparition des effets bénéfiques ou lors de poussées aiguës de la maladie, mais avec prudence en raison de leurs effets secondaires redoutés. La doxycycline par voie orale est quant à elle prescrite essentiellement dans les sécheresses oculaires liées à un dysfonctionnement meibomien ou à une affection palpébrale.

1.2.2.3.1. Ciclosporine

La CsA est actuellement la molécule principalement utilisée dans le traitement de la sécheresse oculaire car elle est la seule molécule approuvée par les agences médicales européennes et américaines dans cette indication. Elle est utilisée pour des traitements au long cours sous forme de collyres : Restasis® (CsA 0,05%) ou Ikervis® (CsA 0,1%).

1.2.2.3.1.1. Mécanisme d'action

La CsA est un décapeptide cyclique produit par le champignon *Tolypocladium inflatum* (481) (Figure 23).

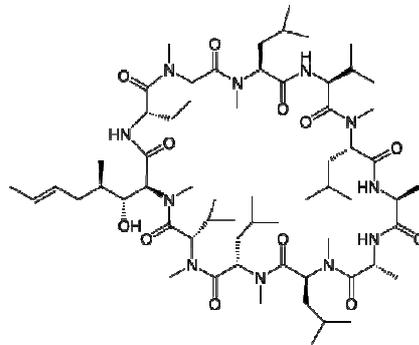
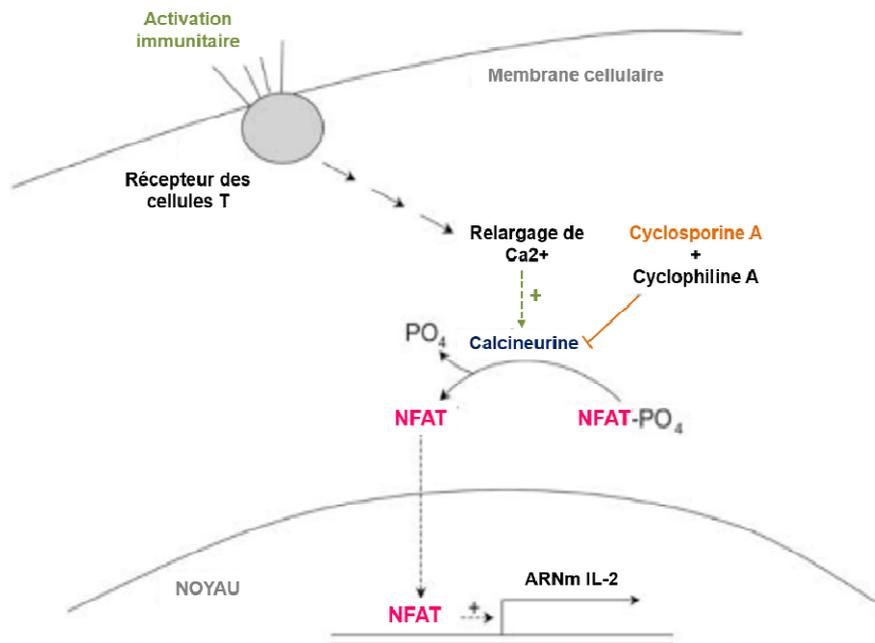


Figure 23. Structure chimique de la CsA.

Les effets de la CsA sont dus à sa liaison à des protéines intracellulaires, les cyclophilines. Son mécanisme d'action a été très étudié en raison de son importante utilisation comme immunosuppresseur pour contrôler les rejets de greffe et traiter les troubles de l'immunité comme le psoriasis ou la polyarthrite rhumatoïde (482). Les études ont ainsi d'abord porté sur sa capacité à inhiber l'activation des lymphocytes T, responsables de son activité immunosuppressive, puis ont observé une autre activité de ce composé : l'inhibition des phénomènes d'apoptose.

Les effets immunosuppresseurs de la CsA sont dus à sa liaison à la cyclophiline A. Dans des conditions d'activation immunitaire, la calcineurine va être activée en réponse à des niveaux élevés de calcium intracellulaire, une conséquence indirecte de la liaison d'un antigène aux récepteurs de la cellule T. Cette protéine intracellulaire qui possède une activité phosphatase va se lier aux membres de la famille des NFATs (1 à 4) en reconnaissant un motif cible se trouvant près de la partie N-terminal du domaine de régulation de ces protéines. Ce domaine de régulation contient également une séquence de localisation nucléaire. Une fois liée à NFAT, la calcineurine va déphosphoryler cette protéine dans le cytoplasme, exposant alors sa séquence de localisation nucléaire et induisant la translocation du complexe calcineurine-NFAT dans le noyau. NFAT va alors pouvoir activer l'expression de gènes codant des cytokines comme IL-2. IL-2, une fois sécrétée, se lie à ses récepteurs sur la surface des cellules T, stimulant l'activation immunitaire et la division cellulaire. Dans le cas où la CsA est présente, celle-ci va se lier à la cyclophiline A intracytoplasmique, le complexe formé va

ensuite s'associer à la calcineurine et inhiber son activité de phosphatase. En empêchant la fin de la cascade impliquant la calcineurine, la CsA empêche la transcription d'IL-2 et d'autres gènes impliqués dans l'activation des cellules T réprimant ainsi les réponse immunitaires (483) (Figure 24).



Adapté de Donnenfeld et al., 2009 (482)

Figure 24. Mécanisme immunosuppresseur de la CsA lié à l'inhibition de la calcineurine.

Notons que l'activité de NFAT5, membre de la famille NFAT, est contrôlée par un mécanisme indépendant de la calcineurine car il ne possède pas la région N-terminale contenant le motif de liaison à cette protéine. Ce facteur de transcription est majoritairement activé par les conditions d'hyperosmolarité comme décrit au début de ce chapitre. La CsA n'a donc a priori pas d'effet inhibiteur de sa translocation dans le noyau *via* le mécanisme de liaison à la cyclophiline A.

L'effet de la CsA sur NFAT5 a été rapporté dans un nombre limité d'études. L'une d'elles menée sur des cellules rénales de rat en condition basale n'a rapporté aucun effet de la CsA sur la localisation de NFAT5 ou la transcription de gènes médiés par NFAT5 (484). Une autre étude menée sur des cellules cornéennes a rapporté quant à elle que la CsA seule induirait une translocation de NFAT5 (485). La CsA aurait ainsi un effet sur NFAT5 qui serait indépendant de la calcineurine et différent de celui qu'elle exerce sur les autres NFAT, qui sont habituellement inhibés par la CsA. Cependant, une autre étude menée sur des lymphocytes a démontré un effet inhibiteur de la CsA sur l'induction de NFAT5 par de l'ionomycine et du PMA mais pas d'effet sur celle induite par l'hyperosmolarité (486). De même, une étude sur des cellules rénales a rapporté que la CsA inhibait la translocation de NFAT5 dans le noyau induite par l'hyperosmolarité (487). Il semble ainsi que la CsA puisse finalement avoir des effets contradictoires sur le NFAT5, ceux-ci étant a priori dépendants du type cellulaire et des conditions d'induction de ce facteur de transcription, les mécanismes intracellulaires sous-jacents étant actuellement inconnus.

La CsA peut également agir *via* sa liaison à la cyclophiline D qui se trouve dans la mitochondrie et induire ainsi une inhibition de l'apoptose. En effet, le complexe CsA-cyclophiline D

inhibe la formation du pore de transition de perméabilité mitochondrial (488,489). L'ouverture de ce pore en réponse à un stress ou un dommage cellulaire est une étape précoce de la cascade apoptotique.

Enfin, concernant l'effet anti-inflammatoire de la CsA, bien que clairement observé par la diminution des marqueurs inflammatoires qu'elle induit, notamment au niveau de la surface oculaire des patients atteints de sécheresse, le mécanisme intracellulaire mis en jeu reste actuellement méconnu.

1.2.2.3.1.2. Effets rapportés sur la sécheresse oculaire

Étant une des premières molécules décelées comme potentiellement thérapeutiques dans le cadre de la sécheresse oculaire, la CsA a été le sujet de nombreuses **études cliniques** cherchant à tester son efficacité et sa tolérance en instillation ophtalmique (490–492). Ces études ont démontré que l'utilisation topique de CsA améliorerait les symptômes cliniques de la pathologie (493), avec amélioration des scores OSDI des patients, ainsi que les signes cliniques classiques : amélioration des épithéliums conjonctival et cornéen, de la sécrétion lacrymale, de l'instabilité lacrymale (494–500), de la densité des cellules à mucus et diminution des aspects de métaplasie squameuse (501–503). L'une de ces études a également rapporté une augmentation des cellules positives au TGF- β 2 dans la conjonctive (503). Notons que les mêmes effets bénéfiques de la CsA ont été rapportés dans des études ayant inclus des patients atteints de sécheresse oculaire avec une étiologie précise : le SGS (504,505), la maladie du rejet du greffon contre l'hôte (506–510), une sécheresse oculaire liée à une chirurgie réfractive de la cornée (511) ou dans le cadre d'un dysfonctionnement meibomien. Ces dernières ont également présenté une diminution de l'inflammation de la paupière et de l'expression de la glande de Meibomius (512,513). La CsA étudiée dans le cadre spécifique du port de lentilles de contact a montré des résultats contradictoires avec une étude montrant une amélioration (514) et une autre ne montrant pas d'effet, mais pour laquelle, d'après les auteurs eux-mêmes, le nombre de patients inclus était faible (515).

De nombreux marqueurs de l'inflammation sont également améliorés par l'application de CsA ophtalmique. C'est le cas dans les empreintes ou biopsies conjonctivales qui rapportent une diminution de HLA-DR, CD40 et CD40L mais également des marqueurs d'apoptose (45,516). La CsA entraîne aussi dans la conjonctive une diminution des cytokines inflammatoires comme IL-6 (517) ainsi qu'une diminution du nombre de lymphocytes activés (505).

Notons que la CsA induit également une amélioration de la sensibilité mécanique cornéenne et conjonctivale chez des patients atteints de sécheresse présentant une sensibilité amoindrie (518).

Les **modèles animaux**, notamment chien et souris, ont également montré des effets bénéfiques de la CsA sur la sécheresse oculaire avec une amélioration des symptômes et des signes cliniques de la pathologie ainsi que des marqueurs de l'inflammation : diminution des signes d'inconfort oculaire, amélioration de la surface oculaire, augmentation de la production de larmes, augmentation du nombre de cellules à mucus avec restauration de leur production de mucines, diminution du nombre de cellules inflammatoires et diminution des phénomènes d'apoptose dans l'épithélium conjonctival (382,519–523). Les mêmes effets de la CsA ont été observés sur les modèles plus spécifiques du SGS avec également une diminution de l'infiltration inflammatoire de la glande lacrymale (524–526).

Concernant les **modèles *in vitro*** de sécheresse oculaire, peu d'expériences ont été menées utilisant la CsA. Deux études dans des modèles d'inflammation induite par stimulation avec IFN- γ et TNF- α ont été rapportées. La première, menée sur des cellules cornéennes, n'a pas rapporté d'effets de la CsA sur les sécrétions de CCL2 et IL-8 induites par IL-1 β (462). La deuxième, menée sur des cellules conjonctivales, a observé un effet inhibiteur de la CsA sur les phénomènes d'apoptose induits par TNF- α et IL-1 β (463). Notons qu'une étude menée sur des cellules épithéliales de la rétine a rapporté que la CsA inhibait l'induction de CCL2 causée par TNF- α mais pas celle induite par IL-1 β (527).

L'ensemble des effets observés dans ces publications démontrent ainsi l'effet bénéfique de la CsA sur la sécheresse oculaire ainsi que l'intérêt des molécules anti-inflammatoires dans le traitement de cette pathologie.

1.2.2.3.1.3. Problématique des formulations de collyres de CsA

L'application de CsA par voie ophtalmique entraîne une accumulation de la molécule au niveau de la surface oculaire avec une pénétration intraoculaire et un passage systémique extrêmement faibles (528).

Le faible passage systémique confère à ce traitement une bonne tolérance avec aucun effet secondaire systémique observé, le principal effet secondaire local observé étant une sensation de brûlure à l'instillation, un effet qui disparaît au fur et à mesure du traitement.

La CsA présente un désavantage lié à l'une de ses propriétés physico-chimiques : sa très faible hydrosolubilité. Cette propriété conduit à des problèmes de formulation et à des caractéristiques pharmacocinétiques peu optimales. En effet, les formulations huileuses de CsA instillées par voie ophtalmologique présentent une biodisponibilité faible ainsi qu'une présence très courte sur la surface oculaire (529,530). De nombreuses recherches ont été effectuées et sont encore en cours afin d'optimiser la formulation combinant une bonne tolérance et une facilité d'administration avec un temps de présence dans l'œil plus élevé, tout en évitant une absorption systémique.

Ces recherches, menées sur des patients ou des modèles *in vivo*, ont pour but d'augmenter la solubilité dans l'eau de la molécule, de faciliter sa pénétration oculaire ou de développer des systèmes permettant une libération en continu de la CsA. C'est le cas d'implants conjonctivaux (531–533), de lentilles de contact en hydrogel-silicone (534) ou encore de bouchons méatiques (535) remplis de CsA qui vont libérer la molécule de façon continue. L'utilisation de petites particules "porteuses" de CsA en suspension dans une solution aqueuse (micelles (536–538), nanoparticules (539–541), liposomes (542), émulsions (494)) constitue la solution la plus étudiée actuellement. C'est le cas du Restasis® et de l'Ikervis® qui sont formulés sous forme d'émulsion. Une CsA sous forme de prodrogue hydrosoluble a également été testée (543).

1.2.2.3.2. Glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont des molécules extrêmement utilisées qui possèdent des effets très variés et qui, par leurs propriétés anti-inflammatoires, peuvent également être utilisées dans la sécheresse oculaire. Ils sont notamment souvent utilisés dans les pays où la CsA n'est pas disponible.

1.2.2.3.2.1. Mécanisme d'action

Les glucocorticoïdes possèdent dans leur structure un noyau stéroïde, cyclopentanophénantrène dérivé du cholestérol (Figure 25).

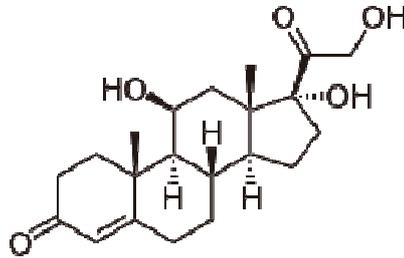


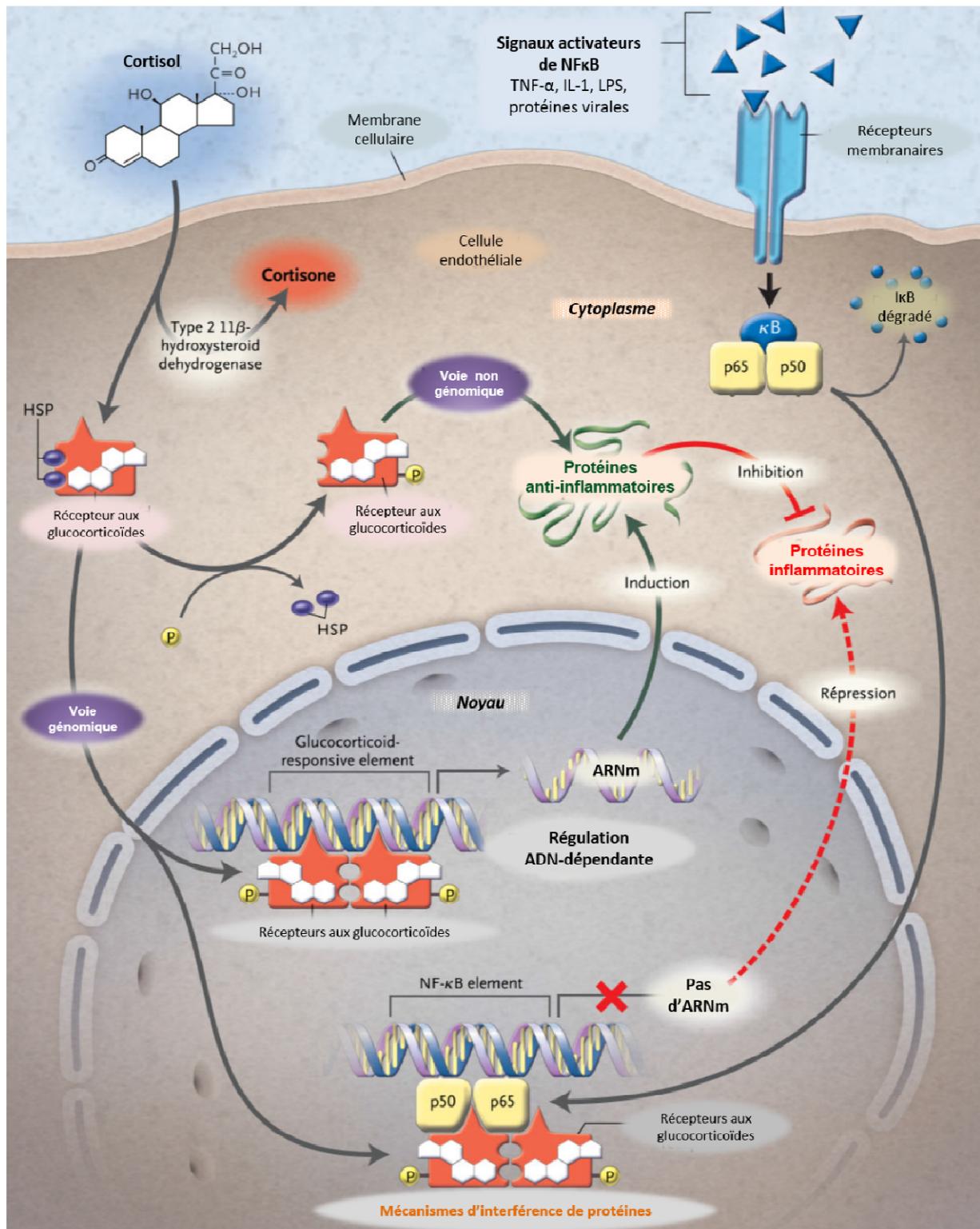
Figure 25. Formule chimique des glucocorticoïdes.

Les propriétés majoritaires des glucocorticoïdes sont anti-inflammatoires, immunosuppresseives, antipyrétiques, analgésiques et antiallergiques. Celles-ci ont conduit à leur utilisation dans divers types de pathologies telles que les maladies auto-immunes ou pour éviter les rejets de greffe, ou traiter les allergies.

L'effet anti-inflammatoire de ces molécules est puissant et la première étape de ce mécanisme est la fixation intracellulaire de ces molécules au récepteur des glucocorticoïdes (544). Les effets anti-inflammatoires vont alors découler de mécanismes différents conduisant à l'induction de protéines anti-inflammatoires et à la répression de protéines pro-inflammatoires (545). Deux de ces voies sont de type génomique et sont chacune dues à la translocation dans le noyau du complexe glucocorticoïde-récepteur des glucocorticoïdes. L'une d'elles, dite génomique directe, est due à la fixation du complexe aux séquences appelées *glucocorticoid responsive-element* conduisant à l'induction de l'expression de protéines pro-inflammatoires ; l'autre, dite génomique indirecte, implique l'interaction au niveau de l'ADN du complexe avec d'autres facteurs de transcription, notamment NFκB (546), conduisant à la répression de l'activité de ces facteurs de transcription et inhibant ainsi l'expression de protéines inflammatoires. Il existe également une troisième voie qui n'est pas de type génomique et qui induit ainsi un effet plus rapide mettant en jeu différents récepteurs et seconds messagers cytoplasmiques mais dont le mécanisme précis est encore peu connu (547) (figure 26).

La voie inflammatoire principalement inhibée par les glucocorticoïdes est celle de la production de prostaglandines, des petites molécules ayant de nombreux effets physiologiques sur plusieurs organes. Elles jouent notamment un rôle dans les phénomènes de vasoconstriction et vasodilatation et possèdent aussi des propriétés pro-inflammatoires. La production des prostaglandines met en jeu la phospholipase A2, une enzyme activée par des stimuli inflammatoires. Cette enzyme une fois activée va conduire à la conversion des phospholipides membranaires en acide arachidonique qui sera ensuite transformé en différentes prostaglandines par l'enzyme cyclooxygénase-2 (COX2). La production des prostaglandines va être bloquée par le complexe glucocorticoïde-récepteur aux glucocorticoïdes conduisant ainsi à un effet anti-inflammatoire. Cette inhibition se fait par trois mécanismes distincts : *via* l'induction de l'expression de l'annexine, une protéine inhibitrice de la phospholipase A2, l'induction de la MAPK phosphatase 1 (548), qui désactive les MAPKs essentielles pour activer la phospholipase A2 en la phosphorylant, et par son

interaction avec NFκB, bloquant ainsi son activité transcriptionnelle et réprimant alors l'expression de la COX2.



In Rhen et al., 2005 (545)

Figure 26. Mécanismes d'action des glucocorticoïdes.

1.2.2.3.2.2. Effets rapportés sur la sécheresse oculaire

Les études cliniques et expérimentales étudiant les effets de l'application topique des glucocorticoïdes sur la sécheresse oculaire ont utilisé diverses molécules : la prednisolone, la méthylprednisolone, la dexaméthasone (Dex), la fluorométholone ou le lotéprednol.

L'ensemble des **études cliniques** menées sur des patients ayant une sécheresse liée ou non à un SGS a montré une amélioration des symptômes et des signes cliniques de la pathologie (augmentation de la sécrétion lacrymale, meilleure stabilité du film lacrymal, amélioration de l'état de la surface oculaire, augmentation de la densité des cellules à mucus) (549–554) ainsi qu'une diminution de l'osmolarité lacrymale (555) après applications topiques de glucocorticoïdes. D'un point de vue inflammatoire, ils induisent une diminution de HLA-DR dans la conjonctive (552,556) ainsi qu'une diminution du taux lacrymal des molécules pro-inflammatoires IL-1 β , IL-8 et CCL2 (555). Notons que cet effet inhibiteur de la Dex sur l'expression de molécules de CMH II est identifié depuis plusieurs décennies dans divers types cellulaires (557).

Les **études menées sur des animaux** soumis à une sécheresse oculaire ont confirmé ces effets liés au traitement par glucocorticoïdes. Il est rapporté en effet une amélioration de la surface oculaire, de la fonction lacrymale avec augmentation de la stabilité du film lacrymal (81,329,394,521), couplée à une diminution des signes de perméabilité cornéenne chez les animaux en sécheresse oculaire traités par des glucocorticoïdes (558). Au niveau de la surface oculaire, il a été également observé une diminution des molécules pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-1 α , IL-10 et IL-12) (393,559,560). Une diminution de l'expression et de l'activité de MMP-9 ainsi que l'activation de p38 dans l'épithélium cornéen ont été rapportées dans une autre étude (560). Il est observé également une diminution de l'infiltration de cellules immunitaires inflammatoires (81,561).

Il existe moins d'**études sur les cellules de la surface oculaire**. Il a néanmoins été rapporté que la Dex inhibe l'expression et la production de TNF- α et d'IL-8 induite par l'hyperosmolarité sur des cellules limbiques (235). Sur des cellules cornéennes, la méthylprednisolone inhibe l'augmentation d'IL-1 β induite par le LPS (41) et la Dex diminue la sécrétion d'IL-8, mais pas celle de CCL2, induites par IL-1 β (462). Dans le modèle 3D de cornée soumis à des conditions de sécheresse, la Dex diminue l'induction de TNF- α et de MMP-9 mais induit également des dommages sur l'épithélium (471).

1.2.2.3.2.3. Problématique de l'utilisation au long cours des glucocorticoïdes ophtalmiques

Malgré l'efficacité importante des glucocorticoïdes pour traiter la sécheresse oculaire, leur utilisation ne peut être mise en place que pour traiter une phase de crise aiguë de la pathologie en cure courte. En effet, le principal inconvénient de la corticothérapie par voie ophtalmique est l'apparition d'effets secondaires importants. Les principaux effets secondaires redoutés sont l'apparition d'une cataracte, d'une hypertension intraoculaire ou le développement d'une kératite infectieuse (562). Ces effets sont d'ailleurs également redoutés en cas d'administration de ces molécules par des voies autres qu'ophtalmiques (563). Il est déjà connu que leur utilisation, quelle que soit la voie d'administration considérée, est à surveiller avec précaution en raison des nombreux effets secondaires qu'ils entraînent, liés aux nombreuses cibles qu'ils possèdent dans l'organisme. Il

est donc recommandé de réduire au maximum la durée d'utilisation des glucocorticoïdes par voie ophtalmique, limitant ainsi leur utilisation dans la sécheresse oculaire chronique. Notons cependant que, suivant les glucocorticoïdes utilisés, leur tendance à engendrer ces effets secondaires peut varier, c'est le cas de la fluorométholone et du lotéprednol qui induisent moins d'augmentation de pression intraoculaire par rapport à la prednisolone ou à la Dex (564).

Des études ont également analysé l'effet combiné de la CsA et de la Dex et ont rapporté que l'addition d'un traitement court par de la Dex en début de traitement par la CsA conduisait à une amélioration plus rapide des symptômes et des signes cliniques (565). Les glucocorticoïdes sont ainsi parfois prescrits en parallèle d'un début de traitement par la CsA afin de réduire le délai d'apparition des effets bénéfiques. *In vivo*, sur un modèle de sécheresse par injection de toxine botulique, la combinaison de ces molécules n'a cependant pas démontré d'avantages probants par rapport aux molécules seules en termes d'amélioration de la surface oculaire (521).

1.2.2.3.2.4. Comparaison avec les effets des anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont été beaucoup moins étudiés dans la sécheresse oculaire en comparaison des AIS. Ces molécules sont parfois utilisées en France dans la sécheresse oculaire mais en raison de leur effet de classe épithéliotoxique, elles ne sont jamais prescrites en cas de kératite. Des complications cornéennes telles que des ulcères cornéens pouvant aller jusqu'à une perforation ont en effet été rapportées, particulièrement chez des patients dont la cornée était déjà altérée. Ces molécules sont ainsi à manipuler avec précautions.

Une **étude clinique** comparant les effets de l'application topique d'un AINS (flurbiprofène) et d'un glucocorticoïde (fluorométholone) chez des patients atteints de sécheresse oculaire a rapporté les effets bénéfiques des corticostéroïdes sur différents signes cliniques mais l'AINS n'a pas présenté d'effets intéressants (552). Notons tout de même que le design de cette étude a fait l'objet d'un commentaire critique, mettant en doute les conclusions de celle-ci (566). Une autre étude a rapporté une plus grande amélioration des symptômes cliniques et une diminution plus importante du marqueur conjonctival HLA-DR lors de l'ajout d'un traitement topique par AINS (pranopofène) en complément d'un traitement par acide hyaluronique (567). D'autre part, une étude a également rapporté l'effet bénéfique de l'association d'un collyre d'AINS (kétorolac) durant la phase d'induction du traitement par CsA en terme d'amélioration des symptômes et d'état de la surface oculaire (568). Enfin, une étude menée sur des patients atteints de SGS a démontré l'amélioration des symptômes de sécheresse oculaire et une amélioration de l'épithélium de la surface oculaire après traitement par des AINS en topique (indométacine ou diclofénac) (569).

Une étude comparant l'effet des AIS à celui des AINS *via un modèle in vivo* de sécheresse oculaire, a démontré une amélioration de l'état de la surface oculaire ainsi qu'une diminution des marqueurs pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β lors d'un traitement topique par glucocorticoïde (fluorométholone) mais pas dans le cas d'un traitement topique par AINS (népafénac ou kétorolac) (393). Cependant, dans une étude *in vivo* étudiant seulement les AINS en topique, l'adjonction d'AINS (pranopofène ou fluorométholone) au traitement par acide hyaluronique a conduit à des effets bénéfiques plus importants sur certains signes de la pathologie (stabilité du film lacrymal, meilleur état de la surface oculaire, disparition de la métaplasie squameuse, cellules à mucus plus nombreuses, diminution du marqueur inflammatoire TNF- α dans la cornée et la conjonctive) (570). En outre, les AINS inhibiteurs de cyclo-oxygénase (kétorolac et nimésulide) ont induit une

amélioration de certains signes cliniques dans un modèle *in vivo* de la pathologie avec une diminution de l'inflammation de la surface oculaire (330). Enfin, une autre étude *in vivo* a démontré que le diclofenac (AINS) en application topique diminuait les dommages cornéens (571). Cette étude a également démontré que cet AINS inhibait l'apoptose et l'expression des marqueurs pro-inflammatoires TNF- α et de MMP-9 induits par le **modèle hyperosmolaire *in vitro*** sur les cellules cornéennes et qu'il stimulait en parallèle l'expression et la translocation de NFAT5 sous hyperosmolarité (l'ensemble de ces résultats n'a pas été observé avec un autre AINS testé, le bromfenac).

Les données concernant les AINS dans la sécheresse oculaire sont ainsi peu nombreuses. Cela est lié à leur utilisation délicate dans le cadre de la sécheresse oculaire dans laquelle la cornée est souvent altérée, faisant redouter au clinicien l'apparition d'effets secondaires cornéens majeurs. Les résultats obtenus lors de ces études sont parfois variables, en raison probablement de la diversité des sous-classes thérapeutiques testées, et peu de ces études ont concerné spécifiquement les effets de ces molécules sur l'inflammation présente dans cette pathologie.

1.2.2.3.3. Dérivés des tétracyclines

La troisième classe de molécules montrant des propriétés anti-inflammatoires utilisées dans la sécheresse oculaire est celle des dérivés de la tétracycline, qui possèdent à la fois des propriétés antibactériennes et des propriétés anti-inflammatoires.

1.2.2.3.3.1. Mécanisme d'action

Les dérivés de la tétracycline présentent une structure chimique comparable à la tétracycline et sont obtenus par des substitutions en position 5, 6 et 7 (figure 27).

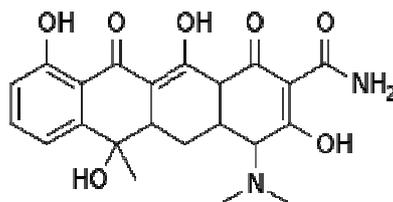


Figure 27. Structure chimique commune aux dérivés de la tétracycline composée de quatre noyaux cycliques accolés.

L'activité antibiotique bactériostatique des dérivés de la tétracycline est liée à leur fixation sur différents sites du ribosome bactérien et notamment à sa sous-unité 30S empêchant ainsi la liaison de l'ARN de transfert (ARNt) au complexe ribosome-ARN messager. Ainsi, elle entraîne l'arrêt de la traduction protéique. Les tétracyclines sont également des puissants inhibiteurs de collagénases (572,573), de la phospholipase A2 (574) et de nombreuses MMPs (575,576), à l'origine de leurs propriétés anti-inflammatoires.

Parmi les tétracyclines, la minocycline et la doxycycline (Dox), qui possèdent une durée de demi-vie longue et qui induisent peu de photosensibilisation, sont celles utilisées en ophtalmologie. Ces molécules sont administrées par voie orale car cette voie conduit à une présence prolongée de ces molécules au niveau de l'œil, notamment au niveau des larmes et de la conjonctive (577,578).

Cette propriété est un avantage par rapport à l'instillation topique, car celle-ci conduit souvent à une évacuation rapide par les larmes des molécules appliquées. Les effets secondaires rapportés en cas de traitement par la Dox et la minocycline à fortes doses sont des effets de types gastro-intestinaux (nausées, diarrhées) et dermatologiques (urticaires, irritations) (579).

1.2.2.3.3.2. Effets rapportés sur la sécheresse oculaire

Les dérivés des tétracyclines sont utilisés par voie orale dans des pathologies qui impliquent des problèmes palpébraux et meibomiens, et qui induisent alors une sécheresse oculaire associée. Ainsi, elles sont souvent prescrites pour traiter les manifestations oculaires de la rosacée (580). Cette pathologie est une maladie inflammatoire dermatologique, caractérisée par une instabilité vasomotrice conduisant à des rougeurs du visage et du cou et qui, par un dysfonctionnement meibomien, peut induire des phénomènes de sécheresse oculaire. Dans les **études cliniques**, les dérivés de la tétracycline diminuent chez cette catégorie de patients les symptômes d'irritation et améliorent la stabilité du film lacrymal (581–583). Les dérivés de la tétracycline sont également utilisés dans les cas de blépharites chroniques, une étude rapporte ainsi que la Dox induit une amélioration des symptômes avec une diminution de l'activité des MMP-9 (584). Les affections touchant les glandes de Meibomius, meibomites ou dysfonctionnements meibomiens, nécessitent souvent un traitement par ces molécules. Des études menées sur ces pathologies ont démontré une amélioration de la stabilité du film lacrymal, une augmentation du volume lacrymal ainsi qu'une amélioration des symptômes après un traitement par les dérivés de la tétracycline (577,579,585,586). Il est à noter que, dans l'une de ces études, la molécule a été administrée par voie systémique. Notons également qu'une étude a cependant rapporté, outre des effets bénéfiques sur les signes cliniques, une diminution du volume lacrymal après traitement par de la minocycline (587). D'après les auteurs, ce résultat pourrait être biaisé par le fait que, dans cette étude, le volume lacrymal des patients au départ était supérieur à la valeur attendue pour cette tranche d'âge et que le traitement n'a fait que diminuer ce volume à une valeur classique de volume lacrymal pour cette population spécifique.

Des **études in vivo** sur des animaux en sécheresse oculaire ont testé les effets de l'administration ophtalmique de Dox. Elles ont démontré une diminution de la perméabilité cornéenne, une diminution de la métaplasie squameuse cornéenne, une prévention de la perte de cellules épithéliales cornéennes, une augmentation de la stabilité lacrymale, une amélioration de la surface oculaire ainsi qu'une amélioration des marqueurs inflammatoires avec diminution de l'expression de cytokines inflammatoires IL-1 β , IL-1 α , IL-6 et TNF- α couplée à une réduction de l'activité des MAPKs et de NF κ B dans l'épithélium cornéen et diminution de l'activité et de l'expression de MMP-9 (80,558,560,588).

La Dox a également été testée dans le **modèle in vitro** hyperosmolaire de sécheresse oculaire sur des cellules limbiques ou cornéennes. Elle inhibe l'activité de JNK, d'ERK et des MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13) ainsi que l'induction de IL-1 β , de TNF- α et d'IL-8 induites par l'hyperosmolarité (235,447). Dans des modèles d'inflammation sur des cellules cornéennes, elle inhibe la production de MMP-9 et l'activation de JNK et ERK et p38 induites par TGF- β (589) et inhibe également l'augmentation d'IL-1 β induite par du LPS (41). En outre, la minocycline inhiberait les

molécules du CMH II sur d'autres types cellulaires, tels que les macrophages (590), mais ces marqueurs n'ont pas été inclus dans le cadre de ces études sur la sécheresse oculaire.

L'ensemble des résultats obtenus à la fois *in vivo* et *in vitro* sur l'effet bénéfique de ces molécules anti-inflammatoires non seulement en termes de réduction des marqueurs inflammatoires, des effets a priori attendus, mais également sur les symptômes et les signes cliniques de la sécheresse oculaire confirme l'importance de la composante inflammatoire de cette pathologie.

1.2.2.4. Le cercle vicieux de la sécheresse oculaire

L'introduction bibliographique de ce manuscrit démontre que de nombreuses études menées sur la sécheresse oculaire ont fait avancer les connaissances en permettant notamment de faire évoluer la définition de la sécheresse oculaire en y incluant les concepts d'hyperosmolarité et d'inflammation de la surface, actuellement considérés comme les phénomènes clés de la pathologie.

Une approche physiopathologique de l'atteinte lacrymale dans la sécheresse oculaire a alors été proposée en 2007 (33) afin d'offrir une approche mécanistique et non plus étiologique de cette pathologie permettant de mieux rendre compte des interrelations entre les différents acteurs de la pathologie déjà identifiés. Le mécanisme de la maladie est présenté sous forme d'un cercle vicieux auto-entretenu, dont les phénomènes centraux sont l'hyperosmolarité lacrymale et l'inflammation, tout en y associant les différentes étiologies qui deviennent dans ce concept des portes d'entrées dans une maladie autonome de la surface oculaire. Ce schéma décrit deux boucles vicieuses, l'une mettant en jeu la surface oculaire et le système nerveux et la seconde les paupières.

S'ajoute à ce cercle vicieux l'implication de plus en plus rapportée du système immunitaire en étroite relation avec l'inflammation de la surface oculaire et participant au maintien de celle-ci (240). Les différentes observations suggèrent que les cellules épithéliales *via* la sécrétion de molécules pro-inflammatoires jouent un rôle important dans la réponse immune innée et inflammatoire par le recrutement de cellules immunitaires, ce qui faciliterait ensuite le développement d'une réponse immune adaptative dysfonctionnelle. Il y aurait ainsi un pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Il apparaît en effet que le processus de présentation d'antigène, qui implique les CPAs, les molécules de CMH II et les molécules de costimulation, soit altéré dans cette pathologie (591). Ces phénomènes sont doublés par l'infiltration de cellules T CD4+ de type Th1 et Th17 dans l'unité fonctionnelle lacrymale (257) et d'un dysfonctionnement des cellules Treg. Ces différents acteurs cellulaires et moléculaires possèdent ainsi un rôle dans la pathologie, mais les mécanismes sous-jacents sont très peu identifiés. En 2005, une approche mécanistique a été proposée concernant l'aspect immunitaire de la sécheresse oculaire (592). Elle propose une cascade d'événements et d'interactions cellulaires entre les cellules épithéliales de la surface et les cellules de l'immunité aboutissant à l'infiltration de celles-ci dans la surface oculaire et créant également un cercle vicieux (593).

Ces deux approches illustrent bien que les dommages de la surface oculaire, l'altération du film lacrymal avec l'hyperosmolarité lacrymale, l'inflammation de la surface et les phénomènes de

réponse immunitaire s'auto-perpétuent à la surface induisant la chronicisation de la maladie. Réunir la composante inflammatoire et la composante immunitaire de la sécheresse oculaire en une seule et même approche semble alors intéressante afin de considérer et rapporter les interrelations extrêmement nombreuses entre les différents acteurs impliqués dans ces phénomènes (Figure 28).

L'instabilité du film lacrymal conduit à une hyperosmolarité au niveau de la surface oculaire. Ce phénomène induit une souffrance cellulaire avec une apoptose des cellules cornéennes et conjonctivales et la mort des cellules à mucus. Un stress pro-inflammatoire local va également se développer, avec libération de médiateurs pro-inflammatoires par les cellules épithéliales tels qu'IL-1 β , TNF- α et IL-8 ainsi que l'activation des MMPs. L'induction de ces phénomènes va en elle-même entretenir l'instabilité du film lacrymal. La souffrance cellulaire va également induire en parallèle une inflammation de type neurogène sur la surface oculaire par la transmission de signaux d'alerte relayés par transmission nerveuse (594). Cette inflammation neurogène est entraînée par une stimulation nerveuse devenue progressivement excessive et inefficace dans ces conditions pathologiques. Elle va alors entretenir l'inflammation de manière plus générale au niveau de l'œil. De plus, la sécheresse oculaire induit une altération de la régulation nerveuse du processus de sécrétion lacrymale ce qui entretient l'instabilité lacrymale (595,596).

La réponse inflammatoire des cellules épithéliales de la surface oculaire à la sécheresse et à l'hyperosmolarité lacrymale stimule la réponse immunitaire. Les facteurs pro-inflammatoires, comme IL-1 β et TNF- α , activent les cellules dendritiques résidentes (593). Le stress dessiccateur stimulerait les acteurs immunitaires, CPAs, *via* le relargage d'auto-antigènes, après le clivage protéolytique d'antigènes de membrane ou *via* l'accélération de phénomènes d'apoptose induisant le relargage d'antigènes intracellulaires. Ces CPAs stimulées migrent vers les ganglions lymphatiques où elles activeront les cellules T CD4⁺ réactives aux antigènes de la surface oculaire. Ces cellules T autoréactives, de type Th1 et Th17, reviendront ensuite vers les glandes lacrymales et la surface oculaire, une migration favorisée par le dysfonctionnement des Treg et l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion et des MMPs par l'épithélium de la surface. Une fois à la surface, ces cellules T vont alors sécréter des cytokines (notamment IFN- γ) qui perturberont à leur tour l'homéostasie de la surface et induiront notamment la perte de cellules à mucus. Ceci aboutira à une aggravation de l'instabilité du film lacrymal et entretiendra le cercle vicieux.

Une autre boucle délétère très importante illustre l'importance des paupières et de la couche lipidique du film lacrymal dans la pathologie. Dans cette boucle, l'instabilité du film lacrymal conduit à une modification de la flore des paupières, flore qui va alors libérer des toxines et lipases bactériennes entraînant une inflammation palpébrale et meibomienne et à une altération de la composition du meibum. Ces effets vont conduire de fait à une modification de la couche lipidique du film lacrymal, renforçant ainsi l'instabilité lacrymale.

L'œil en état de sécheresse oculaire fonctionne en fait dans un véritable cercle vicieux biologique autoentretenu où s'accumulent les facteurs de risque. Ses différentes étiologies sont des portes d'entrées dans une maladie de la surface oculaire devenue autonome dont il est difficile de sortir, expliquant ainsi, dans certains cas, la déconnection de la maladie de sa cause initiale. Plusieurs boucles d'autostimulation s'entrecroisent et perpétuent la maladie. Les phénomènes centraux

déclencheurs les réunissant sont l'instabilité du film lacrymal et l'hyposécrétion lacrymale qui engendrent une hyperosmolarité lacrymale suivie d'une inflammation de la conjonctive et la cornée.

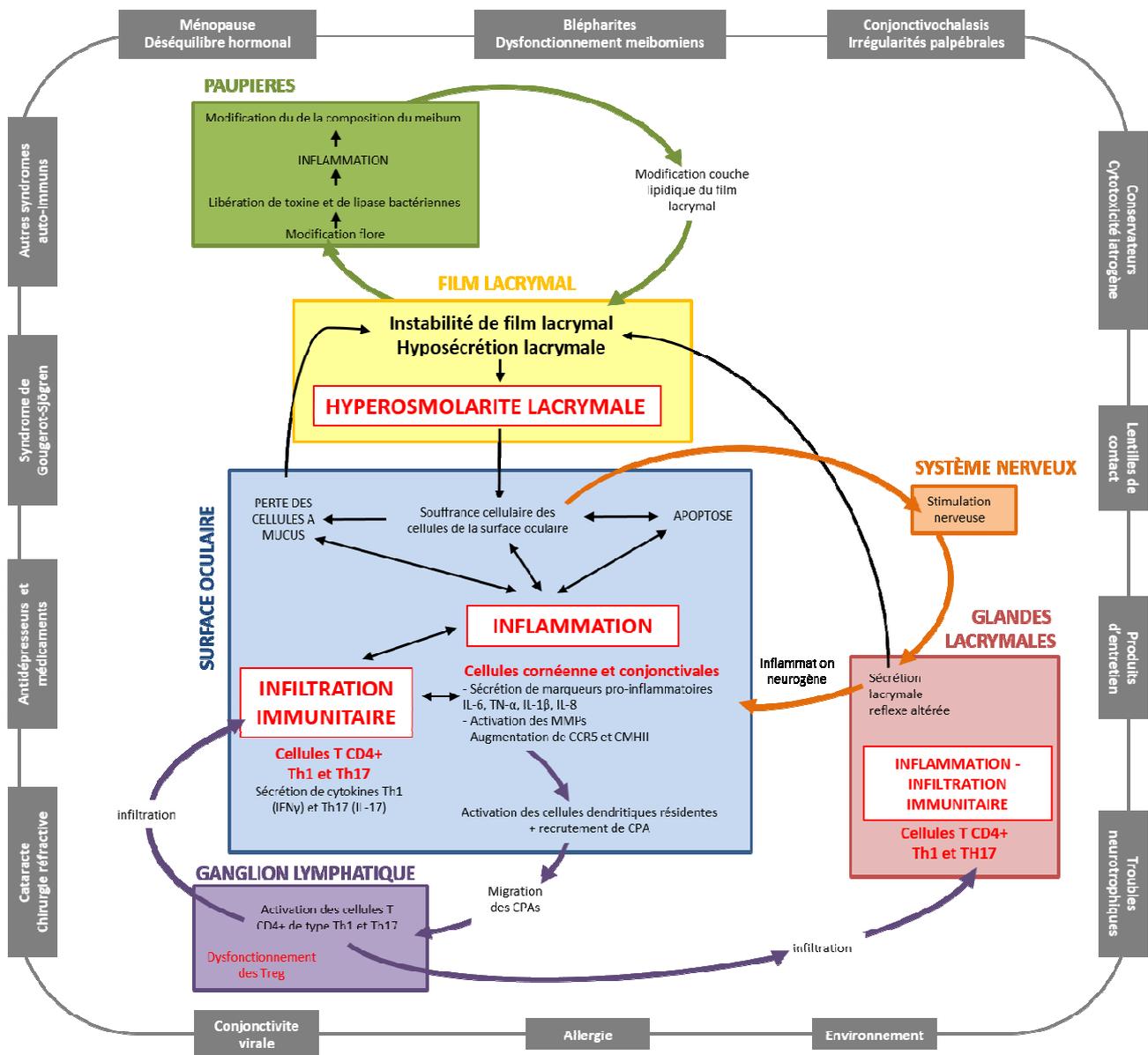


Figure 28. Schéma des différents cercles vicieux entretenant la sécheresse oculaire, adapté de Baudouin, 2007 (33), et McDermott *et al.*, 2005 (592).

Ce schéma permet de souligner que la composante inflammatoire mais également la composante dysmmunitaire sont des phénomènes clés de la sécheresse oculaire. Cependant, les mécanismes intracellulaires précis, ainsi que les interactions cellulaires mises en jeu qui conduisent à l'apparition et au maintien de ce phénomène inflammatoire au niveau de la surface oculaire, sont malgré tout encore peu identifiés. Approfondir les connaissances sur la pathophysiologie de la maladie est indispensable pour faire évoluer la prise en charge thérapeutique des patients afin de pouvoir enfin soulager efficacement les patients. En effet, les traitements actuels de la sécheresse

oculaire sont limités, induisant pour la plupart seulement un soulagement symptomatique plutôt que ciblant précisément la pathophysiologie de la maladie.

Dans la deuxième partie de ce manuscrit, nous allons décrire les principaux résultats de nos recherches sur les mécanismes de la pathophysiologie de la sécheresse oculaire en analysant le comportement de cellules conjonctivales dans un modèle hyperosmolaire de la pathologie en termes de réponses pro-inflammatoires.

2. RÉSULTATS

L'ensemble des travaux menés durant ce travail de thèse a eu pour but d'analyser le comportement pro-inflammatoire des cellules épithéliales conjonctivales soumises à un modèle de sécheresse oculaire *in vitro* : le modèle d'hyperosmolarité par ajout de chlorure de sodium. Ce type cellulaire, bien que recouvrant la majorité de la surface oculaire, est en effet rarement étudié dans les modèles de sécheresse oculaire bien que subissant les mêmes conditions d'hyperosmolarité que les cellules cornéennes, largement plus étudiées. La conjonctive étant un tissu très vascularisé pouvant être le siège de réactions immunitaires et inflammatoires, il est d'autant plus intéressant de connaître le comportement des cellules conjonctivales dans le cadre d'une sécheresse oculaire. Les expériences que nous avons réalisées *in vitro* vont nous permettre de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie et de découvrir de potentielles nouvelles approches pour la thérapeutique de celle-ci.

Dans un premier temps, nous avons déterminé quels marqueurs classiques de l'inflammation sont induits par un stress hyperosmolaire sur ces cellules. Nous avons approfondi cette étude en étudiant l'effet combiné du BAK sur cette inflammation. Les résultats obtenus font l'objet d'un article en soumission.

Après cette première partie du travail, nous avons concentré notre attention sur la caractérisation de la sécrétion de la chimiokine pro-inflammatoire CCL2 induite par l'hyperosmolarité, en étudiant les voies impliquées dans cette induction et plus particulièrement en analysant le rôle du facteur de transcription TonEBP/NFAT5. Nous avons complété cette étude par l'analyse des effets de molécules anti-inflammatoires sur cette induction de CCL2. Cette étude est également le sujet d'un second article en soumission.

Pour finir, nous avons étudié en parallèle une voie de l'inflammation plus particulière, l'inflammasome, en comparant le comportement des cellules conjonctivales à celui d'une lignée de cellules monocytaires dans ce modèle hyperosmolaire.

2.1. EFFETS PRO-INFLAMMATOIRES DE L'HYPEROSMOLARITÉ ET DU BAK

2.1.1. Introduction

L'objectif de ce premier travail a été d'étudier le comportement des cellules conjonctivales sous l'effet d'un milieu hyperosmolaire en termes de sécrétion de marqueurs classiques de l'inflammation, c'est-à-dire les chimiokines et cytokines pro-inflammatoires CCL2, IL-8 et IL-6, ainsi que l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1, ces différents marqueurs ayant été rapportés comme étant augmentés dans des études cliniques ou dans les études *in vivo* et *in vitro* de sécheresse oculaire (122,248,251,289,297,399). Nous avons également étudié une autre cytokine pro-inflammatoire, *macrophage migration inhibitory factor* (MIF), connue pour son rôle dans certaines maladies auto-immunes et dont l'expression est augmentée dans les glandes lacrymales d'animaux chez lesquels une sécheresse oculaire avait été induite à l'aide d'une injection de toxine botulique (399). Nous nous sommes également intéressée au facteur de transcription NFAT5 connu pour son rôle protecteur lors de conditions hyperosmolaires.

D'autre part, nous avons voulu tester l'effet pro-inflammatoire du BAK sur ces cellules, ceci dans le but de confirmer l'hypothèse d'une potentialisation des effets pro-inflammatoires de l'hyperosmolarité et du BAK combinés. Des études cliniques ont déjà démontré que le BAK pouvait induire des signes de sécheresse oculaire (71–73,75). Les études *in vivo* utilisant des instillations de BAK comme modèle de sécheresse oculaire ainsi que des études *in vitro* ont démontré l'effet inducteur de cette molécule sur certains marqueurs de l'inflammation comme IL-1 et TNF- α (87). Une étude précédente a déjà démontré une augmentation des effets délétères sur la viabilité cellulaire des cellules conjonctivales lorsque le BAK était couplé à des conditions d'hyperosmolarité (222). En clinique, cette situation peut se présenter dans le cas de patients traités au long cours avec des collyres contenant du BAK et ayant développé une sécheresse à la suite de l'application régulière de ce conservateur.

2.1.2. Matériel et Méthodes

Nous avons utilisé une lignée cellulaire dérivée de cellules conjonctivales, la lignée WKD (*Wong Kilbourne derivative of Chang conjunctiva*). Cette lignée cellulaire a été obtenue après immortalisation par contact avec des cellules cancéreuses HeLa. Ces cellules ont été cultivées en milieu *Dulbecco minimum essential medium* (DMEM) enrichi avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% de glutamine (200 mM), 1% de pénicilline (10 000 units/mL) et 1% de streptomycine (10 000 μ g/mL) dans des conditions standard (atmosphère humide, 5% CO₂, 37°C). Ce milieu de culture a une osmolarité de 340 mOsM. Les cellules ont ensuite été cultivées en présence d'une hyperosmolarité saline (induite par l'ajout de NaCl) de 500 mOsM, en présence de BAK 3.10-4% ou en présence de la combinaison des deux conditions. L'expression génique et la sécrétion de protéines CCL2, IL-8, IL-6 et MIF ainsi que celles d'ICAM-1 ont été analysées à l'aide de techniques de RTqPCR et d'ELISA. La détection intracytoplasmique de CCL2 et de NFAT5 a été effectuée grâce à des immunomarquages.

2.1.3. Résultats

L'hyperosmolarité a induit l'expression et la sécrétion de CCL2 mais n'a pas eu d'effet sur les autres cytokines pro-inflammatoires testées. Le BAK seul a uniquement induit l'augmentation de l'expression génique d'IL-6. La combinaison des deux stimuli a conduit à une induction de CCL2 moindre que celle induite par l'hyperosmolarité seule et à une sécrétion d'IL-8 et de MIF. L'expression génique d'ICAM-1 et sa sécrétion n'ont pas été modifiées par les conditions testées. NFAT5 a été transloqué dans le noyau dans les conditions d'hyperosmolarité, de BAK seul et de la combinaison des deux conditions.

2.1.4. Conclusion

Les résultats obtenus dans ces expériences supposent que l'inflammation observée dans les cas de sécheresse oculaire ne serait pas uniquement liée aux cellules immunitaires mais pourrait provenir directement et localement des cellules épithéliales conjonctivales, notamment *via* la sécrétion de la chimiokine pro-inflammatoire CCL2. Ce type cellulaire aurait alors un rôle dans l'entretien du cercle vicieux présent au niveau de la surface oculaire caractérisant cette pathologie. Nous avons également observé que le BAK, en plus d'un effet pro-inflammatoire indirect lié à son effet inducteur de sécheresse oculaire, pourrait avoir un rôle aggravant dans la pathologie.

Ces résultats confirment la nécessité d'établir des recommandations concernant l'utilisation de collyres en proscrivant ce conservateur chez les patients atteints de sécheresse oculaire (597).

2.1.5. Article

Article 1: Hyperosmolarity and Benzalkonium Chloride Increase Expression of Inflammatory Markers on Conjunctival Epithelial Cells in Vitro.

Article en soumission à "Cutaneous and ocular toxicology"

Hyperosmolarity and benzalkonium chloride increase expression of inflammatory markers on conjunctiva-derived epithelial cells *in vitro*

Elise Warcoin^{1,2}, Chloé Clouzeau¹, Christophe Roubeix¹, Anne-Laure Raveu¹, David Godefroy¹, Luisa Riancho¹, Christophe Baudouin^{1,3}, Françoise Brignole-Baudouin^{1,4}.

1 Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, 17 rue Moreau, 75012 Paris, France.

2 CHNO des Quinze-Vingts, Service Pharmacie, 28 rue de Charenton, 75012 Paris, France.

3 CHNO des Quinze-Vingts, Service III, 28 rue de Charenton, 75012 Paris, France.

4 Faculté de Pharmacie de Paris, Univ Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75006 Paris, France.

Context: Although dry eye syndrome is a frequent pathology, much remains to be understood about the underlying mechanisms leading to this condition. However, increasing evidences suggest that tear hyperosmolarity is one of the core phenomenons causing ocular surface inflammation in dry eye syndrome. Besides, benzalkonium chloride (BAK), the most commonly used preservative in eye drops, is known to induce dry eye in long-term treated patients and animal models. Analyzing the modulation of the pro-inflammatory potential of hyperosmolarity in presence of BAK on the conjunctiva, could then give new insights on the potential aggravating effect of this preservative on the dry eye disease.

Objective : To investigate inflammatory markers in NaCl-induced hyperosmolar conditions in a conjunctival epithelium-derived cell line, in the presence or absence of the preservative BAK.

Materials and methods: Conjunctiva-derived epithelial cells were cultured in hyperosmolar conditions (500 mOsm), in BAK (3.10-4%) and in a combination of the two. The pro-inflammatory chemokines CCL2, IL-8 and IL-6, the macrophage migration inhibitory factor (MIF), the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and the osmoprotectant-sensitive element Nuclear factor of activated T-cells 5 (NFAT5) were assessed using ELISA, RT-qPCR or , immunofluorescence staining.

Results: Hyperosmolarity highly increased CCL2 in terms of secretion, gene expression and cytoplasmic level in conjunctiva-derived cells whereas BAK 3.10-4% alone stimulated IL-6 expression. These conditions combined induced an increase of CCL2 but smaller compared to hyperosmolar conditions alone, an increase in MIF and IL-8 secretion and a decrease in MIF expression. Neither ICAM-1 secretion nor expression was modulated by any of the conditions tested. The osmoprotectant NFAT5 was activated and translocated to the nucleus in hyperosmolar, BAK and combined conditions.

Discussion: In this *in vitro* model, hyperosmolarity induced the release of the pro-inflammatory chemokine CCL2 by conjunctiva-derived cells. This study also demonstrates that BAK can be a direct pro-inflammatory agent on the ocular surface as well as an indirect one by inducing dry eye disease in long-term use. This study also brings to light a potential pro-inflammatory effect of instillations of eyedrops containing BAK on the ocular surface of patients with dry eye disease.

Conclusion: This *in vitro* hyperosmolarity model highlights the importance of avoiding treatments with eye drops containing BAK in patients with dry eye conditions.

INTRODUCTION

Dry eye physiopathology encompasses a large number of mechanisms and possible etiologies. The latest Dry Eye Workshop defined dry eye as a multifactorial disease involving the tear film and the ocular surface, which is driven by tear hyperosmolarity and inflammatory reactions (1). This pathology can be caused or sustained by repeated environmental stresses, such as pollutants, allergens, contact lenses or the extensive use of preservatives, such as benzalkonium chloride (BAK). Dry eye results in symptoms of discomfort, visual disturbance and a lack of protection of the surface epithelia by the tear film with potential damage to the ocular surface. The revised definition supports increasing evidence that inflammation is a core mechanism of

dry eye (2–5). In fact, dysregulated inflammation is a continuous pathological response to stress inducing dry eye disease. Conjunctiva is a protective and reactive tissue of the ocular surface and is submitted to the same environmental challenges as cornea and responds differently. The corneal tissue, which is highly innervated and whose transparency is mandatory for visual function, has already been studied in response to hyperosmotic stress (6). However, little is known on the behavior of conjunctival epithelium in hyperosmolar or toxic conditions regarding inflammation. Few *in vitro* and *in vivo* hyperosmolarity studies have been conducted on conjunctival cells (7–9) in comparison to corneal cells (10–15). Instead, many *in vivo* models of dry eye disease have been built to assess the

inflammatory consequences of dry eye syndrome (16,17). In parallel, BAK has been shown to increase tear hyperosmolarity in glaucoma patients treated over the long term for glaucoma (18). Moreover, glaucoma treatments have been widely demonstrated in many observational studies to be associated with a high prevalence of dry eye (19,20), most likely to a large extent in relationship with the use of BAK as preservative over the long term. Many studies in dry eye patients have demonstrated that inflammatory events were induced through the secretion of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecule expression involved in the activation of immune cell trafficking and associated with an increased number of T lymphocyte infiltrates in the conjunctiva (21–23). These findings were also confirmed in animal models of dry eye disease (17) and in *in vitro* models (10). Several studies showed that the expression of immune-related antigens such as human leukocyte antigen (HLA-DR) and the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) are increased in the conjunctival cells of impression cytology specimens in dry eye patients (21,22,24) as well as on human conjunctival epithelium in hyperosmolar conditions (7).

In addition, inflammation in dry eye disease is also mediated by numerous cytokines, such as IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 and macrophage migration inhibitory factor (MIF) (10,17), which play crucial roles in the regulation of this process by activating and recruiting inflammatory cells. Using an animal model, Goyal et al. highlighted the importance of the inflammatory chemokine CCL2, through the blockade of its receptor CCR-2, associated with an improvement in the disease and characterized by a decrease in clinical and cellular inflammation (16). Moreover, CCL2 expression was shown to be increased by sucrose-induced hyperosmolar conditions in corneal cells, as well as IL-6 and IL-8 (11,12), and in normal rat kidney cells (25). Interestingly, the osmoprotectant element NFAT5 was involved in this CCL2 upregulation (26) and is known to be activated in corneal cells and to mediate induction of some cytokines after a hyperosmotic challenge (27). Other interesting findings demonstrated that some proteins were also involved in dry eye disease inflammation, such as MIF, which was found to be overexpressed in a murine dry eye model in the lacrimal glands (28). In a NaCl-induced hyperosmolar model intended to reproduce a key feature of dry eye, we previously demonstrated that BAK, the most commonly used preservative in eyedrops, potentiated cytotoxic and oxidative stress of hyperosmolarity (8). Other studies have shown that BAK induces large pro-inflammatory effects on conjunctiva-derived cells

in vivo in patients exposed to BAK over the long periods of time and in experimental toxicological models (29,30).

These findings prompted us to determine the effects of hyperosmolarity stress on this cell type to determine (i) the inflammatory markers CCL2, IL-8, IL-6, MIF, ICAM-1, and the osmoprotectant element NFAT5 gene and protein expression and (ii) how BAK influences the inflammatory response independently or in association with hyperosmolar conditions.

METHODS

Cell line

The Wong Kilbourne derivative of the Chang (WKD) conjunctival epithelial cell line (clone 1-5c-4, American Type Culture Collection [ATCC] certified cell line [CCL], 20.2) was cultured under standard conditions (moist atmosphere, 5% CO₂, 37°C) in Dulbecco minimum essential medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% glutamine (200mM), 1% penicillin (10,000 units/mL) and streptomycin (10,000 μ g/mL) for 24h to reach confluence before stimulations. All reagents for cellular culture were purchased from Gibco (Cergy Pontoise, France). This cell line has previously been used for toxicological *in vitro* studies and was shown to respond similarly to the IOBA -NHC conjunctival cell line (31). Despite the criticism on this cell line, immortalized by contact with cervical cancer HeLa Cells, we decided to use it after having confirmed the conjunctival phenotype by a cytokeratin 13 flow cytometry analysis (32) and because it does not require supplementation of hydrocortisone, as IOBA-NHC cells do.

Hyperosmolar condition preparation and control

Each hyperosmolar medium was prepared by adding sodium chloride (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) to the supplemented medium. All osmolarity values were assessed using an osmometer (Roebeling 13DR, Berlin, Germany) including the supplemented medium, which was found at 340 mOsM as expected from information provided by the manufacturer. This level was defined as the basal control osmolarity under which the cell line was kept. Its value narrowly exceeds the expected osmolarity in normal tear films (302.2 \pm 8.3 mOsM) and that in dry eye subjects (336.4 \pm 22.3 mOsM) (33).

Cell stimulation protocol

At confluence, cells were grown for 24h, as previously published (8) : (1) in supplemented DMEM considered as the control condition (340 mOsM), called Control,; (2) in hyperosmolar medium achieved by adding sodium chloride (NaCl, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) in

supplemented DMEM (500 mOsm), called HO ; (3) in supplemented DMEM containing BAK (Fluka, Buchs, Switzerland) at 3.10–4% (340 mOsm), called BAK, or (4) in a combination of hyperosmolarity and BAK 3.10–4% (500 mOsm), HO+BAK. After this incubation period, cells or cellular supernatant were collected and treated to perform the following assays.

Hour-long exposures to hyperosmolar conditions of 500 mOsm may appear drastic compared to the lachrymal osmolarity seen in dry eye patients, but they are a classic protocol used in dry eye *in vitro* studies. Moreover, clinical studies have detected hyperosmolarities as high as 424 mOsm (34) in dry eye patients and peaks of 800–900 mOsm are thought to occur over the central cornea during tear film instability (35). Concerning the concentration of BAK tested, we used a much lower concentration of BAK in comparison with ophthalmic formulations (BAK 3.10-4% vs 2.10-2%) because we choose to apply it during 24 continuous hours whereas in clinical conditions the ocular surface is only exposed for 20 minutes several times per day and over years (36).

Cell viability

Cellular viability was analyzed by evaluating the abundance of ATP, which is related to the presence of metabolically active cells, using the CellTiter-Glo® assay (Promega, Madison, WI, USA). After a 24-h incubation period in the different stress conditions, CellTiter-Glo® reagent was added to the cellular medium following the manufacturer's protocol. Luminescence was then quantified using a microplate reader (Infinite M1000, Tecan, Lyon, France). Luminescence values were then reported to the value obtained for control cells considered as 100% of viability.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISAs for human CCL2, IL-8, MIF, IL-6 and soluble ICAM-1 detection were performed using the commercial DuoSet ELISA Development kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). After a 24-h incubation period in the different stress conditions, cellular supernatants were collected, centrifuged to remove potential cellular fragments and ELISAs were performed according to the manufacturer's protocols on supernatants. Absorbances were read at 450 nm using a microplate reader (Infinite M1000, Tecan) with a reference wavelength of 570 nm.

Immunostaining

Cells were grown on round sterile cover glasses (diameter, 14mm; Menzel GmbH, Braunschweig, Germany). After the 24-h period of incubation in the different stress conditions, cells were washed and fixed in 4% paraformaldehyde-PBS. Then they were permeabilized in a 0.3% Triton X-100 (Sigma-

Aldrich) solution for intracellular staining, followed by a 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) incubation for 30 min and a 1-h staining period with the primary antibodies: anti-CCL2 (mouse, IgG; R&D Systems) and anti-NFAT5 (goat IgG; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Then cells were incubated for 1h with the secondary antibody Alexa Fluor 488 goat anti-mouse and 488 rabbit anti-goat (Invitrogen, Life technologies, Carlsbad, CA, USA) before a 15-min incubation with DAPI (Sigma-Aldrich). Cover glasses were then mounted with Mountant PermaFluor® (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France), before observation with an epifluorescence microscope (Leica DM6000B, Rueil-Malmaison, France).

Real-time PCR

After the 24-h incubation period in the different stress conditions, the cells were washed, then lysed, and total RNA was extracted using the NucleoSpin RNA II extraction kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). RNA content was measured using a NanoDrop detector (ND-1000 spectrophotometer) and cDNA was synthesized from equal amounts of RNA (660ng) using Multiscribe reverse transcriptase (TaqMan Reverse Transcription Reagents, Applied Biosystems, Life Technologies). Concentrations of each sample were adjusted to 5 ng/μL of cDNA. The reaction mixture containing 25 ng of cDNA per well was preheated at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles (95°C/15s and 60°C/1 min). Each assay, carried out in triplicate, was normalized by amplifying the housekeeping cDNA GAPDH (ID Hs9999905). Target cDNA was amplified using the 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Life Technologies) with assays-on-demand primers for human CCL2 (ID Hs00234140), IL-8 (ID Hs00174103), IL-6 (ID Hs00985639), MIF (ID Hs00236988) and ICAM-1 (ID Hs00164932) (Applied Biosystems, Life Technologies). Relative quantification of target mRNA was assessed according to the comparative Ct method (2- $\Delta\Delta Ct$); the results are presented as the relative fold change compared to unstimulated control.

Statistical analyses

All experiments were conducted in triplicate or more and the groups were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test (GraphPad, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). A *p*-value <0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

The CellTiter-Glo® viability assay (Figure 1) showed a decrease in cellular viability with the three

conditions tested compared to control cells : 80% viability with HO (not significantly different), 65% with BAK ($p \leq 0.01$) and 30% with HO+BAK ($p \leq 0.0001$). Combining HO and BAK significantly decreased cellular viability compared to each condition alone.

Concerning the protein secretion, HO increased CCL2 secretion by conjunctiva-derived cells in comparison with control cells (291pg/mL and 18pg/mL, respectively, $p \leq 0.0001$) (Figure 2.A). The two other conditions tested containing BAK did not induce any significant difference in CCL2 secretion from conjunctiva-derived cells compared to control cells. A significantly higher level of IL-8 and MIF in the supernatant was observed in HO+BAK condition compared to control conditions and to HO and BAK conditions alone (145pg/mL for IL-8 and 382pg/mL for MIF) ($p \leq 0.05$ and $p \leq 0.001$ respectively, compared to controls) (Figure 2A and 2B). The IL-6 secretion was not affected by any of the conditions tested (Figure 2C).

The two hyperosmolar conditions tested significantly increased CCL2 gene expression in conjunctiva-derived cells compared to control cells: a 59.6-fold increase was observed for HO ($p \leq 0.0001$) and a 30.0-fold increase for HO +BAK ($p \leq 0.001$) (Figure 3A). The CCL2 mRNA expression in cells with HO was significantly higher than the one in cells under HO+BAK conditions ($p \leq 0.0001$). BAK alone did not induce any change in CCL2 gene expression. No significant change was observed either in IL-8 and MIF gene expression (Figure 3B and 3C), but BAK conditions did lead to a significant increase in IL-6 mRNA expression compared to control cells ($p \leq 0.05$).

An increase in the intracytoplasmic level of CCL2 when conjunctiva-derived cells were exposed to hyperosmolarity was confirmed by immunofluorescent staining (Figure 4A). Immunostaining of NFAT5 (Figure 4B) showed that hyperosmolar conditions (HO and HO+BAK conditions) induced an increase in NFAT5 expression and its translocation from the cytoplasm to the nucleus in conjunctiva-derived cells compared to control cells. We observed two cellular populations with cells treated with BAK alone, the preponderant one showing diffuse staining as high as in control cells and the other showing a translocation of NFAT5 in the nucleus. However, hyperosmolarity, whether associated with BAK or not, induced the translocation of NFAT5 more than in control cells or BAK alone.

Soluble ICAM-1 secretion and ICAM-1 gene expression were not modified in any of the three conditions tested (data not shown).

DISCUSSION

This study investigated whether hyperosmolar or BAK conditions could induce inflammation in conjunctival cells. We used a conjunctiva-derived cell line for studying inflammatory markers induced by hyperosmotic and toxic stresses, regarding the expression of CCL2, IL-8, IL-6, MIF, ICAM-1 and the osmoprotectant element NFAT5 in order to exhibit the active participation of inflammation to dry eye disease pathophysiology. This *in vitro* model does not fully reflect what happens in patients, because it is based on only one cell type, exempt of tear film, vessels, goblet cells or immune cells that strongly interact with each other, in particular during the inflammation process. However, the conjunctival epithelium remains of interest for studying the inflammatory behavior of the ocular surface.

Hyperosmolarity is now considered as a predictive parameter of dry eye assessment and a good diagnosis criterion for the disease (37,38), showing better correlation with symptoms than standard clinical dry eye signs (39,40). Recently, hyperosmolarity at the epithelial cell level has been proposed as a potent inducer of inflammatory events and the increased expression of inflammatory markers has been shown to exhibit high correlations with tear osmolarity values in dry eye patients (7). At the same time, BAK has been demonstrated to induce dry eye disease by causing tear film instability and hyposecretion. Some studies have even used topical instillations of BAK to develop a new animal model for dry eye disease (30,41,42). Likewise, high levels of inflammation have been measured in glaucoma patients receiving BAK-containing eye drops (29,43). In such studies, tear hyperosmolarity has been associated with the number of BAK eyedrops instilled (18). In addition, in experimental *in vivo* models, several studies have linked BAK and inflammation in ocular surface epithelial cells (30) and in an *in vitro* study on conjunctival and corneal cells, BAK induced pro-inflammatory markers like TNF- α or IL-1 (44).

In our study, we confirmed that the expression and secretion of the pro-inflammatory chemokine CCL2 is highly stimulated by NaCl-induced hyperosmolar conditions in conjunctiva-derived cells. This increase in CCL2 gene expression in hyperosmolar conditions has been reported in corneal cells (11,12) and in other cell types such as kidney cells (25). BAK 3.10–4% had no effect on CCL2 secretion or gene expression. However, adding BAK to hyperosmolar conditions led to a significant decrease in the level of CCL2 secretion and gene expression. This could be due to the cellular

mortality that occurs under these conditions and that leads to different cellular behavior. The importance of CCL2 in dry eye disease, already demonstrated by Goyal et al. in an animal model (16), is confirmed in our *in vitro* model.

We also found that the osmoprotectant element NFAT5, shown to be involved in inflammatory disorders (45), was activated in our model by hyperosmolar conditions and even with the preservative BAK. Recently, studies on mesothelial cells and kidney cells have linked CCL2 upregulation induced by hyperosmolarity to NFAT5 activation (26,46) and a study on limbal cells demonstrated that induction of IL-1 β and TNF- α by hyperosmolarity was linked to NFAT5 (27). We observed in conjunctiva-derived cells that NFAT5 could become an advantageous pathway to explore especially concerning its potential link to hyperosmolarity-induced CCL2 secretion, and possibly to target future treatments, given its role at the crossroads between inflammatory and hyperosmolar responses in dry eye patients.

In addition to these findings, we have addressed the role of MIF, a macrophage activator playing a role as a pro-inflammatory cytokine in autoimmune diseases (47). Recent studies have suggested that this cytokine may also be involved in dry eye disease physiopathology (48). Its expression was notably found to increase in an *in vivo* dry eye model (28). The IL-8 cytokine was also investigated as it is found in higher concentrations within the tears of patients with dry eye disease (49) and increases in hyperosmolar *in vitro* dry eye models on limbal cells (10) and corneal cells (12). Surprisingly, in our model, hyperosmolarity did not affect MIF and IL-8 expression or secretion. This could be explained by the conjunctiva-derived cell type that we have worked with, because its response to hyperosmolar stress may differ from that of more commonly studied ocular cells. *In vivo*, IL-8 and MIF could be produced by cell types other than epithelial cells, which could explain why we did not find these proteins overexpressed in our simple monocellular model. In support of this hypothesis, the weak expression of IL-8 on conjunctival epithelial cells has been documented in healthy and moderate dry eye patients using impression cytology (50) and an identical hyperosmolar protocol on primary conjunctival cells was not observed to induce IL-8 secretion (9). BAK alone did not induce either of these pro-inflammatory markers. However, the combination of hyperosmolarity and BAK induced a significant increase of MIF and IL-8 secretion in supernatants after 24 hours of exposure without affecting their expression. A previous study showed that subjecting cells to these conditions induces

apoptotic processes and disrupts membrane integrity (8). Together, these results suggest that the membrane disruption induced by the combination of hyperosmolarity and BAK leads to leakage of a preformed stock of MIF and IL-8 in the extracellular medium. This finding brings to light a potential pro-inflammatory hazard in treating dry eye disease with eyedrops containing BAK.

An increased concentration of pro-inflammatory cytokines and chemokines in the tear fluid and on impression cytology has been extensively reported (49,51), and IL-6 is one of them (52). Moreover, sucrose-induced hyperosmolarity has been observed to increase IL-6 in corneal cells (11). However, our model with NaCl-induced hyperosmolarity did not induce any change in IL-6 secretion or expression by conjunctiva-derived cells, but BAK3.10-4% alone did increase IL-6 mRNA expression, confirming the direct pro-inflammatory effect of BAK via IL-6 on these cells. This BAK-caused increase in IL-6 was reported *in vitro* on corneal and epithelial cells (53,54). Likewise, the increase in the adhesion molecule ICAM-1, found in dry eye (21,51) and glaucoma patients treated with eyedrops containing BAK (29), was not found to be modulated in our model by any treatment.

As for MIF and IL-8 studies, IL-6 and ICAM-1 should be further investigated with different hyperosmolar protocols and with coculture systems that could better represent the physiological environment of conjunctival cells.

CONCLUSION

In conclusion, our *in vitro* study supports the hypothesis that inflammation is involved in dry eye physiopathology, through the induction of the CCL2 inflammatory marker on the ocular surface following hyperosmotic stress. These findings suggest that inflammation could be induced locally on ocular surface epithelia, and is not only restricted to immune cells. In so doing, it could participate in the self-perpetuating circle of dry eye disease (1,3). Our data thus directly connect hyperosmolarity and inflammatory response on conjunctiva-derived epithelial cells, since epithelial cells were able to secrete and release the pro-inflammatory chemokine CCL2. We chose markers and chemokines expected to play a role in dry eye pathophysiology, but further candidates could be screened to find new targets for therapeutic development. Additionally, the commonly used preservative BAK may also be a potent inducer of inflammation that could aggravate the pathology when used in topical treatments for dry eye patients. These results argue in favor of

preservative-free eye drops when treating dry eye and conditions requiring long-term treatments.

REFERENCES

1. DEWS. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf.* 2007;5(2):75–92.
2. Stern ME, Pflugfelder SC. Inflammation in dry eye. *Ocul Surf.* 2004;2(2):124–30.
3. Baudouin C, Aragona P, Messmer EM, Tomlinson A, Calonge M, Boboridis KG, et al. Role of Hyperosmolarity in the Pathogenesis and Management of Dry Eye Disease: Proceedings of the OCEAN Group Meeting. *Ocul Surf.* 2013 Oct;11(4):246–58.
4. De Paiva CS, Pflugfelder SC. Rationale for anti-inflammatory therapy in dry eye syndrome. *Arq Bras Oftalmol.* 2008;71(6 Suppl):89–95.
5. Wei Y, Asbell PA. The core mechanism of dry eye disease is inflammation. *Eye Contact Lens.* 2014;40(4):248–56.
6. Gilbard J, Carter J, Sang D, Refojo M, Hanninen L, Kenyon K. Morphologic effect of hyperosmolarity on rabbit corneal epithelium. *Ophthalmology.* 1984;91(10):1205–12.
7. Versura P, Profazio V, Schiavi C, Campos EC. Hyperosmolar stress upregulates HLA-DR expression in human conjunctival epithelium in dry eye patients and in vitro models. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52(8):5488–96.
8. Clouzeau C, Godefroy D, Riancho L, Rostène W, Baudouin C, Brignole-Baudouin F. Hyperosmolarity potentiates toxic effects of benzalkonium chloride on conjunctival epithelial cells in vitro. *Mol Vis.* 2012; 18:851–63.
9. Kang S, Ha S, Kim E, Shin J, Kim JY, Tchah H. Effect of Nerve Growth Factor on the In Vitro Induction of Apoptosis of Human Conjunctival Epithelial Cells by Hyperosmolar Stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014; 55(1):535–41.
10. Li D, Luo L, Chen Z, Kim H-S, Song XJ, Pflugfelder SC. JNK and ERK MAP kinases mediate induction of IL-1 β , TNF- α and IL-8 following hyperosmolar stress in human limbal epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2006; 82(4):588–96.
11. Cavet ME, Harrington KL, Vollmer TR, Ward KW, Zhang J-Z. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of the green tea polyphenol epigallocatechin gallate in human corneal epithelial cells. *Mol Vis.* 2011; 17:533–42.
12. Cavet ME, Harrington KL, Ward KW, Zhang J-Z. Mapracorat, a novel selective glucocorticoid receptor agonist, inhibits hyperosmolar-induced cytokine release and MAPK pathways in human corneal epithelial cells. *Mol Vis.* 2010;16:1791–800.
13. Luo L, Li D-Q, Corrales RM, Pflugfelder SC. Hyperosmolar saline is a proinflammatory stress on the mouse ocular surface. *Eye Contact Lens.* 2005;31(5):186–93.
14. Pan Z, Wang Z, Yang H, Zhang F, Reinach PS. TRPV1 activation is required for hypertonicity-stimulated inflammatory cytokine release in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(1):485–93.
15. Zheng Q, Ren Y, Reinach PS, Xiao B, Lu H, Zhu Y, et al. Reactive oxygen species activated NLRP3 inflammasomes initiate inflammation in hyperosmolarity stressed human corneal epithelial cells and environment-induced dry eye patients. *Exp Eye Res.* 2015;134:133–40.
16. Goyal S, Chauhan SK, Zhang Q, Dana R. Amelioration of Murine Dry Eye Disease by Topical Antagonist to Chemokine Receptor 2. *Arch Ophthalmol.* 2009;127(7):882–7.
17. Zhu L, Shen J, Zhang C, Park CY, Kohanim S, Yew M, et al. Inflammatory cytokine expression on the ocular surface in the Botulium toxin B induced murine dry eye model. *Mol Vis.* 2009;15:250–8.
18. Janulevičienė I, Derkač I, Grybauskiene L, Paulauskaitė R, Gromnickaite R, Kuzmienė L. Effects of preservative-free tafluprost on tear film osmolarity, tolerability, and intraocular pressure in previously treated patients with open-angle glaucoma. *Clin Ophthalmol.* 2012;6:103–9.
19. Leung EW, Medeiros FA, Weinreb RN. Prevalence of ocular surface disease in glaucoma patients. *J Glaucoma.* 2008; 17(5):350–5.
20. Fechtner RD, Godfrey DG, Budenz D, Stewart J a, Stewart WC, Jasek MC. Prevalence of ocular surface complaints in patients with glaucoma using topical intraocular pressure-lowering medications. *Cornea.* 2010; 29(6):618–21.
21. Pisella P, Brignole F, Debbasch C, Lozato P, Creuzot-garcher C, Bara J, et al. Flow Cytometric Analysis of Conjunctival Epithelium in Ocular Rosacea and Keratoconjunctivis Sicca. *Ophthalmology.* 2000; 101(10):1841–9.
22. Stern ME, Gao J, Schwalb TA, Ngo M, Tieu DD, Chan C, et al. Conjunctival T-Cell Subpopulations in Sjogren’s and Non-Sjogren’s Patients with Dry Eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43(8):2609–14.
23. Barabino S, Montaldo E, Solignani F, Valente C, Mingari MC, Rolando M. Immune response in the conjunctival epithelium of patients with dry eye. *Exp Eye Res.* Elsevier Ltd; 2010 Oct; 91(4):524–9.
24. Tsubota K, Fujihara T, Saito K, Takeuchi T. Conjunctival epithelium expression of HLA-DR in dry eye patients. *Ophthalmologica.* 1999; 213(1):16–9.
25. Matsuo H, Tamura M, Kabashima N, Serino R, Tokunaga M, Shibata T, et al. Prednisolone inhibits hyperosmolarity-induced expression of MCP-1 via

- NF-kappaB in peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int.* 2006; 69(4):736–46.
26. Küper C, Beck F-X, Neuhofer W. NFAT5 contributes to osmolality-induced MCP-1 expression in mesothelial cells. *Mediators Inflamm.* 2012; 2012:513015.
27. Lee JH, Kim M, Im YS, Choi W, Byeon SH, Lee HK. NFAT5 induction and its role in hyperosmolar stressed human limbal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49(5):1827–35.
28. Park CY, Zhuang W, Lekhanont K, Zhang C, Cano M, Lee W-S, et al. Lacrimal gland inflammatory cytokine gene expression in the botulinum toxin B-induced murine dry eye model. *Mol Vis.* 2007;13:2222–32.
29. Pisella P, Debbasch C, Hamard P, Creuzot-Garcher C, Rat P, Brignole F, et al. Conjunctival Proinflammatory and Proapoptotic Effects of Latanoprost and Preserved and Unpreserved Timolol: An Ex Vivo and In Vitro Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(5):1360–8.
30. Lin Z, Liu X, Zhou T, Wang Y, Bai L, He H, et al. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride. *Mol Vis.* 2011; 17:257–64.
31. Brasnu E, Brignole-Baudouin F, Riancho L, Warnet J-M, Baudouin C. Comparative study on the cytotoxic effects of benzalkonium chloride on the Wong-Kilbourne derivative of Chang conjunctival and IOBA-NHC cell lines. *Mol Vis.* 2008;14:394–402.
32. Ramirez-miranda A, Nakatsu MN, Zareighanavati S, Nguyen C V, Deng SX. Keratin 13 is a more specific marker of conjunctival epithelium than keratin 19. *Mol Vis.* 2011;17:1652–61.
33. Sullivan BD, Whitmer D, Nichols KK, Tomlinson A, Foulks GN, Geerling G, et al. An objective approach to dry eye disease severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51(12):6125–30.
34. Gilbard JP, Farris RL, Santamaria J. Osmolarity of tear microvolumes in keratoconjunctivitis sicca. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960) [Internet].* 1978; 96(4):677–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/646697>
35. Liu H, Begley C, Chen M, Bradley A, Bonanno J, McNamara NA, et al. A link between tear instability and hyperosmolarity in dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50(8):3671–9.
36. Friedlaender MH, Breshears D, Amoozgar B, Sheardown H, Senchyna M. The dilution of benzalkonium chloride (BAK) in the tear film. *Adv Ther [Internet].* 2006 Jan [cited 2015 Nov 23]; 23(6):835–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17276951>
37. Farris RL. Tear osmolarity—a new gold standard? *Adv Exp Med Biol.* 1994;350:495–503.
38. Lemp MA, Bron AJ, Baudouin C, Benítez Del Castillo JM, Geffen D, Tauber J, et al. Tear osmolarity in the diagnosis and management of dry eye disease. *Am J Ophthalmol.* 2011; 151(5):792–8.
39. Suzuki M, Massingale ML, Ye F, Godbold J, Elfassy T, Vallabhajosyula M, et al. Tear osmolarity as a biomarker for dry eye disease severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(9):4557–61.
40. Versura P, Profazio V, Campos EC. Performance of tear osmolarity compared to previous diagnostic tests for dry eye diseases. *Curr Eye Res.* 2010;35(7):553–64.
41. Zhang Z, Yang W-Z, Zhu Z-Z, Hu Q-Q, Chen Y-F, He H, et al. Therapeutic effects of topical doxycycline in a benzalkonium chloride-induced mouse dry eye model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014; 55(5):2963–74.
42. Beyazyıldız E, Acar U, Beyazyıldız Ö, Pınarlı FA, Albayrak A, Uğurlu N, et al. Comparison of prednisolone acetate and loteprednol etabonate for the treatment of benzalkonium chloride-induced dry eye syndrome in rats. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2014; 30(4):306–12.
43. Baudouin C, Liang H, Hamard P, Riancho L, Creuzot-Garcher C, Warnet J-M, et al. 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 Jan; 115(1):109–15.
44. 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(5):415–24.
45. Neuhofer W. Role of NFAT5 in inflammatory disorders associated with osmotic stress. *Curr Genomics.* 2010; 11(8):584–90.
46. Kojima R, Taniguchi H, Tsuzuki A, Nakamura K, Sakakura Y, Ito M. Hypertonicity-induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 through a novel cis-acting element and MAPK signaling pathways. *J Immunol.* 2010; 184(9):5253–62.
47. Bucala R, Lolis E. Macrophage migration inhibitory factor: a critical component of autoimmune inflammatory diseases. *Drug News Perspect.* 2005; 18(7):417–26.
48. Willeke P, Gaubitz M, Schotte H, Maaser C, Domschke W, Schlüter B, et al. Increased serum levels of macrophage migration inhibitory factor in patients with primary Sjögren’s syndrome. *Arthritis Res Ther.* 2007 Jan; 9(2):R43.
49. Massingale ML, Li X, Vallabhajosyula M, Chen D, Wei Y, Asbell P a. Analysis of inflammatory cytokines in the tears of dry eye patients. *Cornea.* 2009;28(9):1023–7.

50. Narayanan S, Miller WL, McDermott AM. Conjunctival cytokine expression in symptomatic moderate dry eye subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47(6):2445–50.
51. Jones DT, Monroy D, Ji Z, Atherton SS, Pflugfelder SC. Sjogren's Syndrome : Cytokine and Epstein-Barr Viral Gene Expression Within the Conjunctival Epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994; 35(9):3493–504.
52. Yoon K-C, Jeong I-Y, Park Y-G, Yang S-Y. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in tears of patients with dry eye syndrome. *Cornea.* 2007; 26(4):431–7.
53. Paimela T, Ryhänen T, Kauppinen A, Marttila L, Salminen A, Kaarniranta K. The preservative polyquaternium-1 increases cytotoxicity and NF-kappaB linked inflammation in human corneal epithelial cells. *Mol Vis.* 2012;18:1189–96.
54. Guzmán M, Sabbione F, Gabelloni ML, Vanzulli S, Trevani AS, Giordano MN, et al. Restoring conjunctival tolerance by topical nuclear factor-κB inhibitors reduces preservative-facilitated allergic conjunctivitis in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(9):6116–26.

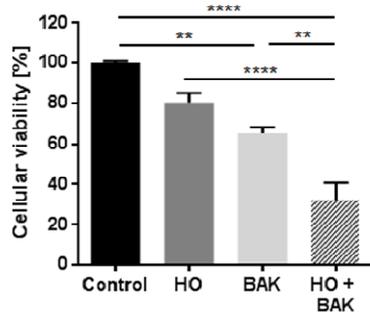


Figure 1. Cell viability assessed by CellTiter-Glo® assay. Conjunctiva-derived epithelial cells were exposed to medium (control cells), HO500, BAK3.10⁻⁴% and HO500+BAK3.10⁻⁴% solutions for 24h. Cells treated with HO did not show any difference in viability compared to control. Solutions containing BAK induced a significant decrease in viability compared to control cells. Data showing mean ± SEM, n = 3 or more. Statistical analysis: one way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. * p ≤ 0.05 ; ** p ≤ 0.01 ; *** p ≤ 0.001 ; **** p ≤ 0.0001

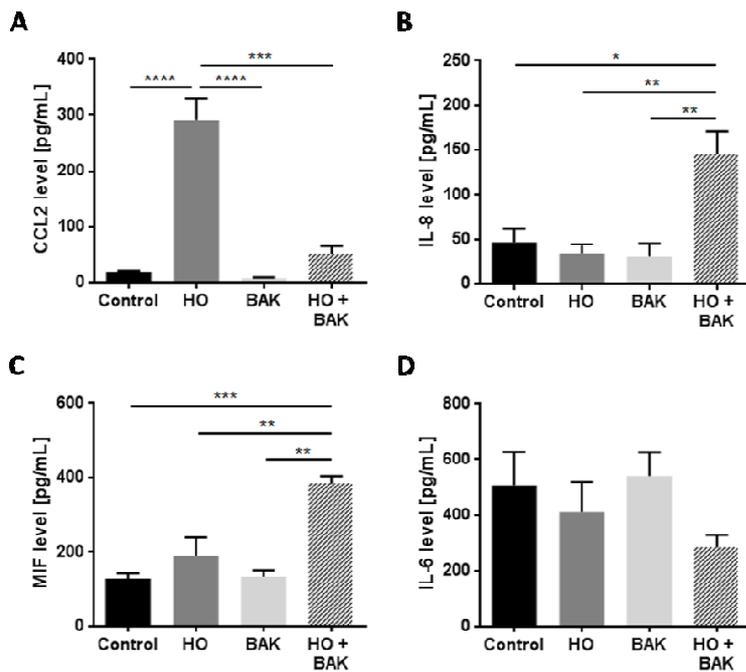


Figure 2. Evaluation of cytokines and chemokines secretion. Conjunctiva-derived epithelial cells were exposed to medium (control cells), HO500, BAK3.10⁻⁴% and HO500+BAK3.10⁻⁴% solutions for 24h. Concentrations of **CCL2 (A)**, **IL-8 (B)**, **MIF (C)** and **IL-6 (D)** in supernatants were evaluated by ELISA. HO significantly increased CCL2 secretion compared to all other conditions. HO+BAK solution significantly increased IL-8 and MIF secretion compared to all other conditions. None of the conditions induced a change in IL-6 secretion. Data showing mean ± SEM, n = 3 or more. Statistical analysis: one way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. * p ≤ 0.05 ; ** p ≤ 0.01 ; *** p ≤ 0.001 ; **** p ≤ 0.0001.

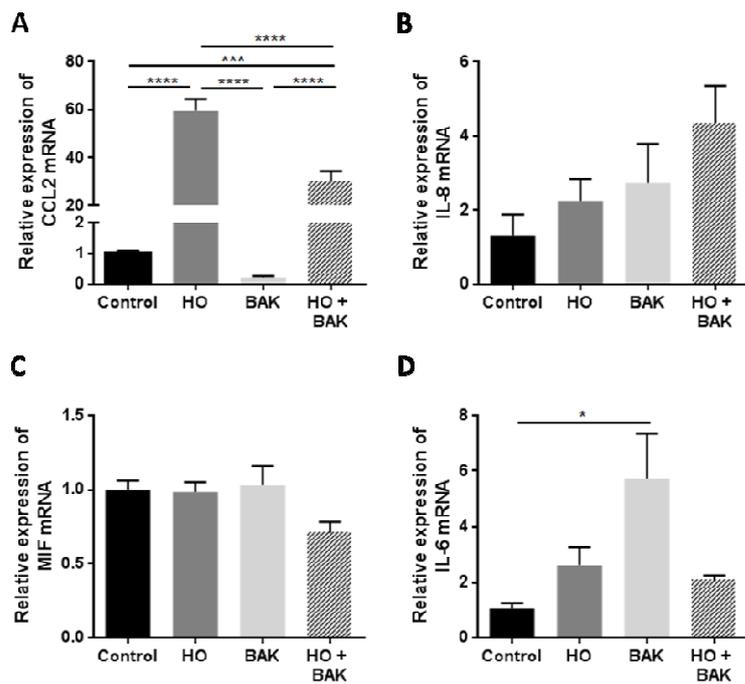


Figure 3. Evaluation of cytokines and chemokines gene expression. Conjunctiva-derived epithelial cells were exposed to medium (control cells), HO500, BAK3.10⁻⁴% and HO500+BAK3.10⁻⁴% solutions for 24h. Relative expressions of CCL2 (A), IL-8 (B), MIF (C) and IL-6 (D) mRNA were evaluated by RT-qPCR. Data were normalized using GAPDH as a housekeeping gene. Conditions with HO induced a significant increase in CCL2 gene expression. BAK solution significantly increased IL-6 secretion compared to control. Data showing mean ± SEM, n = 3 or more. Statistical analysis: one way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. * p ≤ 0.05 ; ** p ≤ 0.01 ; *** p ≤ 0.001 ; **** p ≤ 0.0001

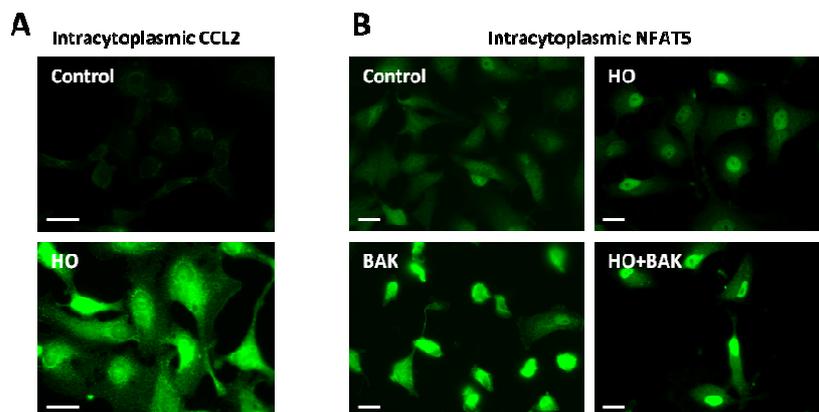


Figure 4. Intracellular detection of CCL2 and NFAT5. Conjunctiva-derived epithelial cells were exposed to medium (control cells), HO500, BAK3.10⁻⁴% and HO500+BAK3.10⁻⁴% solutions for 24 h. White scale bar : 20µm. **A. Immunostaining of CCL2.** Specific staining appears in green. Fluorescence increased in the HO500 condition compared to control. Pictures concerning BAK conditions are not shown because the cells were too few and too altered for interpretation. **B. Immunostaining of NFAT5.** Specific staining appears in green. NFAT5 translocated from the cytoplasm to the nucleus in HO500 and the HO500+BAK3.10⁻⁴% conditions while it appeared as a weak and diffuse staining in control cells. BAK3.10⁻⁴% alone showed two cellular populations, the preponderant one showing high diffuse staining like control and the other showing a translocation of NFAT5 in the nucleus.

2.2. CARACTÉRISATION DE L'INDUCTION DE CCL2 PAR L'HYPEROSMOLARITÉ - RÔLE DE NFAT5

2.2.1. Introduction

Au vu de des résultats obtenus dans les expériences précédentes et notamment l'importante induction de la chimiokine pro-inflammatoire CCL2 dans ce modèle d'hyperosmolarité, nous avons voulu étudier plus particulièrement cette chimiokine dans la suite de nos recherches.

Cette chimiokine est considérée comme une chimiokine majeure de la réaction inflammatoire et elle a déjà été identifiée comme ayant un rôle potentiel dans certaines maladies inflammatoires chronique telles que la sclérose en plaques. L'intérêt d'étudier CCL2 dans la sécheresse oculaire est appuyé par le fait que son taux est augmenté dans les larmes des patients atteints (289) et que cette chimiokine est également augmentée dans la cornée d'un modèle *in vivo* de SGS (376). De plus, une étude *in vivo* a rapporté une amélioration des symptômes de sécheresse oculaire et des marqueurs biologiques pro-inflammatoires induits par le modèle, *via* l'application topique d'un antagoniste du récepteur de CCL2, CCR2 (437).

Dans un premier temps nous avons caractérisé l'induction de CCL2 par l'hyperosmolarité, en termes d'expression génique et de sécrétion. Le but était de définir les conditions expérimentales optimales pour la suite de notre étude.

Nous avons ensuite cherché à déterminer les acteurs intracellulaires impliqués dans cette induction de CCL2. Pour cela, nous avons étudié le rôle de différentes voies intracellulaires telles que les MAPKs, qui sont activées avec ce modèle de sécheresse hyperosmolaire sur des cellules cornéennes (172,176), ainsi que le facteur de transcription NFκB, également stimulé dans même modèle (451). En étudiant ces acteurs, nous voulions déterminer si les cellules conjonctivales mettaient en jeu les mêmes voies de signalisation que les cellules cornéennes sous l'effet de notre modèle de sécheresse hyperosmolaire.

Notre analyse s'est ensuite focalisée sur un autre facteur de transcription connu pour son rôle essentiel dans l'adaptation des cellules au stress hyperosmolaire, NFAT5. En effet, dans notre travail précédent, nous avons confirmé la translocation de ce facteur dans le noyau des cellules conjonctivales, sous les conditions d'hyperosmolarité. Afin de mieux caractériser la réponse cellulaire à l'hyperosmolarité, nous avons donc étudié les interrelations entre CCL2 et NFAT5. Des études récentes ont en effet mis en évidence que l'induction de CCL2 par l'hyperosmolarité est liée à ce facteur de transcription sur des cellules mésothéliales et rénales (249,598). De plus, une étude sur des cellules limbiques a montré que l'hyperosmolarité induit à la fois la translocation de NFAT5 et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et TNF-α et que ces deux phénomènes sont liés (221).

Pour compléter cette étude et rechercher si cette voie de signalisation serait une bonne cible thérapeutique à approfondir pour traiter la sécheresse oculaire, nous avons également étudié l'effet de trois molécules anti-inflammatoires (CsA, Dex et Dox) sur l'induction de CCL2 et de NFAT5.

2.2.2. Matériel et Méthodes

Nous avons utilisé la lignée cellulaire conjonctivale WKD. Ces cellules ont été cultivées en présence d'hyperosmolarité saline (400 mOsM à 600 mOsM) pendant différents temps d'exposition (30 min à 24 h), afin de caractériser l'induction de CCL2 et de NFAT5 par l'hyperosmolarité. Dans certaines expériences, des *small interfering RNA* (siRNA) anti-NFAT5, des inhibiteurs de MAPKs et de NFκB, ou des molécules thérapeutiques (CsA, Dex et Dox) ont été ajoutés 1h avant l'hyperosmolarité. La viabilité cellulaire a été analysée à l'aide du test CellTiterBlue® qui évalue l'activité métabolique des cellules. L'expression génique de CCL2 et de NFAT5 a été analysée grâce à des techniques de RTqPCR et la sécrétion de CCL2 a été analysée en ELISA. La détection intracytoplasmique de NFAT5 a été effectuée en immunomarquages fluorescents.

2.2.3. Résultats

L'hyperosmolarité a induit l'expression génique et la sécrétion de CCL2 de façon concentration- et temps-dépendante sur les cellules conjonctivales. Cette condition a également conduit à l'augmentation de l'expression génique de NFAT5 et à sa translocation dans le noyau. Le prétraitement de ces cellules sous hyperosmolarité avec des siRNAs anti-NFAT5 a conduit à l'inhibition totale de l'induction de CCL2 ainsi qu'à une diminution de la viabilité cellulaire. Le prétraitement des cellules avec des inhibiteurs de p38, JNK et de NFκB ainsi qu'avec de la CsA et de la Dex a conduit à une inhibition de l'induction de CCL2 à l'inverse de la Dox et de l'inhibiteur d'ERK qui n'ont pas présenté cet effet. En outre, la Dex a également inhibé l'expression génique de NFAT5 induite par l'hyperosmolarité.

2.2.4. Conclusions

Les résultats obtenus dans cette étude permettent de mieux comprendre les mécanismes de sécrétion de CCL2 par les cellules conjonctivales soumises à des conditions mimant les conditions de sécheresse oculaire. Cette induction de CCL2 par l'hyperosmolarité apparaît comme totalement dépendante de NFAT5 et également partiellement dépendante de p38, JNK et NFκB.

Ces résultats innovants sur les cellules conjonctivales nécessitent d'être approfondis afin de déterminer l'ordre d'intervention de ces différents acteurs pour mieux caractériser la cascade intracellulaire mise en route. Déterminer d'autres acteurs plus spécifiques que ces voies classiques cellulaires dans cette cascade inflammatoire est également nécessaire afin de pouvoir développer par la suite une approche thérapeutique ciblée. Pour définir ces cibles potentielles, élucider plus en profondeur les mécanismes moléculaires de la CsA et de la Dex peut également aider à identifier des pistes de recherche.

2.2.5. Article

Article 2: « *Inhibition of NFAT5-mediated induction of CCL2 in hyperosmotic conditions by cyclosporine and dexamethasone on conjunctival cells in vitro* »
Article en soumission à "Plos One"

Inhibition of NFAT5-mediated induction of CCL2 in hyperosmotic conditions by cyclosporine and dexamethasone on conjunctival cells in vitro

Elise Warcoï^{1,2}, Christophe Baudouin^{1,3}, Carole Gard⁴, Françoise Brignole-Baudouin^{1,5}.

1 Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, 17 rue Moreau, 75012 Paris, France.

2 CHNO des Quinze-Vingts, Service Pharmacie, 28 rue de Charenton, 75012 Paris, France.

3 CHNO des Quinze-Vingts, Service III, 28 rue de Charenton, 75012 Paris, France.

4 Horus Pharma, 148 Avenue G. Guynemer, 06700 Saint-Laurent du Var, France.

5 Faculté de Pharmacie de Paris, Univ Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75006 Paris, France.

Purpose: To investigate the pro-inflammatory intracellular mechanisms induced by an *in vitro* model of dry eye disease (DED) on conjunctival cells in hyperosmolarity (HO) stress conditions. This study focused on CCL2 induction and explored the implications of the nuclear factor of activated T-cells 5 (NFAT5) as well as MAPKs and NFκB. This work was completed by an analysis of the effects of cyclosporine A (CsA), dexamethasone (Dex) and doxycycline (Dox) on HO-induced CCL2 and NFAT5 induction.

Methods: A human conjunctiva-derived cell line was cultured in NaCl-hyperosmolar medium for various exposure times. Cellular viability, CCL2 secretion, NFAT5 and CCL2 gene expression, and intracytoplasmic NFAT5 were assessed using the Cell Titer Blue[®] assay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), RT-qPCR and immunostaining, respectively. In selected experiments, inhibitors of MAPKs or NFκB, therapeutic agents or NFAT5 siRNAs were added before the hyperosmolar stimulations.

Results: Hyperosmolarity induced CCL2 secretion and expression as well as NFAT5 gene expression and translocation. Adding NFAT5-siRNA before hyperosmolar stimulation led to a complete inhibition of CCL2 induction and to a decrease in cellular viability. p38, JNK and NFκB inhibitors, CsA and Dex induced a partial inhibition of HO-induced CCL2, while Dox and ERK inhibitor did not. Dex also induced a partial inhibition of HO-induced NFAT5 gene expression but not CsA or Dox.

Conclusions: These *in vitro* results suggest a potential role of CCL2 in DED and highlight the crucial role of NFAT5 in the pro-inflammatory effect of hyperosmolarity on conjunctival cells, a rarely studied cellular type. This inflammatory pathway involving NFAT5 and CCL2 could offer a promising target for developing new therapies to treat DED, warranting further investigations to fully grasp the complete intracellular mechanisms.

INTRODUCTION

Dry eye disease (DED) is one of the most common ocular pathologies in the world, with a prevalence of 3–15% (1) in patients over the age of 50, which is often underestimated because of its apparent harmlessness. However, patients with severe dry eye syndrome suffer from eye irritation symptoms as well as blurred and fluctuating vision, (2,3) which complicate daily tasks such as performing professional work, using a computer, reading and driving (4). This impact on their quality of life may in turn lead to anxiety and even depression (5). Topical cyclosporine A (CsA) is the only drug specifically formulated to treat dry eye syndrome and approved by regulatory medical agencies (FDA, EMA). Restasis[®] (Allergan) and Ikervis[®] (Santen) were launched on the market in 2002 and 2015, respectively, and provide an alternative to artificial tears, dexamethasone (Dex) and doxycycline (Dox). CsA presents several properties including immunosuppressive and anti-inflammatory effects, but its exact therapeutic mechanisms on the ocular surface of dry eye patients remains unclear.

The number of patients suffering from DED is set to grow as the world population ages. A better understanding of the pathophysiology of DED and the mechanism of CsA could help find new targets

for treating this pathology and relieve millions of patients from permanent and painful discomfort. DED is due to a dysfunction of the lachrymal functional unit resulting in decreased tear secretion and/or excessive evaporation of the aqueous tear phase. These effects then lead to an increase in tear film osmolarity, tear film instability and ultimately damages the ocular surface (6). Tear hyperosmolarity (HO) and ocular surface inflammation are currently considered as the two key mechanisms underlying DED that maintain the vicious circle of the pathology on the ocular surface by stimulating several biologic events that further impair tear function (1,7–9). Clinical studies on patients with DED have highlighted the key role that ocular surface inflammation plays in this disease. They notably report an increase in pro-inflammatory cytokines and chemokines in tears and conjunctival cells such as interleukin (IL) -6, IL-8, TNF-α and IL-1β; a loss in conjunctival goblet cells; and an increase in immune activation and infiltration in the conjunctiva (10–15). To help understand the pathogenesis of DED, hyperosmolar conditions are often used in *in vivo* and *in vitro* studies because they reproduce the environment in contact with the ocular surface in the pathology. These experiments have shown that

HO was responsible for ocular surface cell death (16,17), reactive oxygen species formation (18,19), activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) such as p38 MAPK (p38), c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) (20–22) and increases in production of matrix metalloproteinases (MMP), such as MMP-9, (23) and pro-inflammatory markers including cytokines such as IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-6 and CCL2 (24–29).

The molecular mechanism that regulates the transcription and secretion of these pro-inflammatory actors under hyperosmolar conditions is poorly understood. Among the actors involved, CCL2, a potent chemoattractant protein that attracts monocytes to the inflammation site (30), and its receptor CCR2 have been identified as potentially important actors in DED. Indeed, Goya et al. discovered that a topical antagonist of CCR2 improved dry eye symptoms in *in vivo* experiments (31). On other cell types such as renal tubular epithelial cells and peritoneal mesothelial cells, the induction of pro-inflammatory cytokines such as CCL2 by osmotic stress has been observed to depend on the "nuclear factor of activated T-cells 5" (NFAT5) transcription factor, also called the tonicity response element-binding protein (TonEBP) (32,33). HO is already known to induce NFAT5 translocation to promote cellular adaptation and survival from hypertonic stress (34). Its activation in response to HO most particularly regulates the transcription of target genes that lead to the accumulation of compatible osmolytes inside cells, promoting better protection. Concerning ocular studies, a study on human limbal cells showed that IL-1 β and TNF- α are induced in NaCl-induced hyperosmolar conditions via NFAT5 activation (35). These accumulated observations suggest that NFAT5 could play a preponderant role in the inflammation induced by hypertonic challenge.

Except for the study on cell death (16), no work has been specifically dedicated to the epithelial conjunctival cell inflammatory responses, and conjunctival cells remain less studied than corneal cells to date despite being directly exposed to HO and also being a major victim of and actor in the disease. Indeed, conjunctival cells collected from dry eye patients express MHC class II antigen, HLA-DR, ICAM-1 and CCR5, confirming their involvement in the pathological process (13,36–38). The conjunctival inflammation is also reported in several *in vivo* model of the pathology (39,40). Therefore, our aim was to analyze and characterize *in vitro* conjunctival CCL2 induction in a hyperosmolar model of dry eye and to determine the relationship between NFAT5 and CCL2 on

conjunctival cells. Moreover, we investigated intracellular signaling pathways such as MAPKs (p38, JNK and ERK) and the NF κ B transcription factor. We also investigated the effects of the three major anti-inflammatory therapeutic agents: CsA, Dex and Dox on CCL2 and NFAT5 induction by HO. These molecules are used in DED patients as an acute or chronic treatment, and understanding their anti-inflammatory mechanism on the desiccated ocular surface would help develop new targeted therapies.

MATERIAL AND METHODS

Cell line

The Wong Kilbourne derivative of the Chang (WKD) conjunctival epithelial cell line (clone 1-5c-4, American Type Culture Collection [ATCC] certified cell line [CCL], 20.2) was cultured under classic conditions (moist atmosphere, 5% CO₂, 37°C) in Dulbecco minimum essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% glutamine (200 mM), 1% penicillin (10,000 units/mL) and streptomycin (10,000 μ g/mL) for 24 h to reach either 80% confluence before hyperosmolar stimulations and to reach 50% confluence before transfection for siRNA experiments. All reagents for cellular culture were purchased from Gibco (Gibco, Life technologies, Carlsbad, CA, USA). This cell line has previously been used for toxicological *in vitro* studies and was shown to respond similarly to the IOBA conjunctival cell line(41). Despite the criticism on this cell line, immortalized by contact with cervical cancer HeLa Cells, we decided to use it after having confirmed the conjunctival phenotype by a cytokeratin 13 flow cytometry analysis (42) and because it does not require supplementation of hydrocortisone.

Hyperosmolar condition preparation and control

Each hyperosmolar medium was prepared by adding sodium chloride (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) to supplemented medium. All osmolarity values were assessed using an osmometer (Roebbling 13DR, Berlin, Germany) including the supplemented medium, which was found at 340 mOsm as expected from information provided by the manufacturer. We decided not to change this osmolarity level in order to keep the cell line in its regular medium even if this value is above the expected values of normal tear film, i.e., 302.2 \pm 8.3 mOsm/L, and in order to avoid any hypo-osmotic regulatory effects. In dry eye subjects, tear osmolarity is found at 336.4 \pm 22.3 mOsm/L (43) and spikes of 800–900 mOsm/L are thought to occur over the central cornea during tear film instability (8).

Cell treatments

For experiments that analyzed a range of hyperosmolar conditions, cells were treated with supplemented medium (340 mOsM) or with hyperosmolar medium ranging from 400 mOsM to 600 mOsM for 4 h before collecting cell lysates for real-time quantitative PCR (RT-qPCR), or 24 h before collecting supernatants for ELISA, performing the cell viability test or fixing cells for immunostaining. For the time-course experiments, cells were treated with medium (340 mOsM) or with hyperosmolar medium (500 mOsM) for durations ranging from 30 min to 24 h before collecting cell lysates for RT-qPCR, supernatants for ELISA or performing the cell viability test.

For the siRNA experiments, cells were treated with a mix of lipofectamine (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and negative control siRNA (Life Technologies) or NFAT5 siRNA (Life Technologies) for 24 h, as recommended by the manufacturer. After this period of transfection, the cell medium was replaced by supplemented medium (340 mOsM) or hyperosmolar medium (500 mOsM) for 4 h before collecting cell lysates for RT-qPCR or 24 h before collecting supernatants for ELISA or performing the cell viability test.

For experiments testing the effects of therapeutic agents or cellular pathway inhibitors, cells were treated for 1 h with various dilutions of therapeutic agents. CsA was tested at 0.1, 1 and 10 µg/mL; the highest concentration of 10 µg/mL corresponding to 1/100 and 1/50 of Ikervis® and Restasis®, respectively. Dex was tested at 10-10, 10-8 and 10-6M and Dox at 10 µg/mL. A mix of CsA 10 µg/mL and Dex 10-8 M was also tested. The inhibitors of p38 (SB203580), JNK (SP600125) and MEK/ERK (UO126) (inhibitor of MEK1 and hence of its downstream target ERK) were tested at 10 µM while the NFκB inhibitor (PDTC) was tested at 50 µM. The concentrations tested were chosen regarding previous published studies (20,44,45) and after confirming their innocuity on conjunctival cells with a cellular viability test, the CellTiter-Blue® assay (Promega, Madison, WI, USA). Therapeutic agents and inhibitors were all purchased from Sigma-Aldrich and were reconstituted with dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich). They were diluted in supplemented medium to achieve a final concentration of DMSO equal to 0.1%. The control condition for these experiments was DMSO 0.1% in supplemented medium. After a 1-h incubation, supplemented medium or hyperosmolar medium at 980 mOsM was added to induce a dilution of ¼ of the existing medium, leading to a final osmolarity of 340 mOsM and 500 mOsM, respectively. These conditions were applied for 4 h

before collecting cell lysates for RT-qPCR, or 24 h before collecting supernatants for ELISA or performing the cell viability test.

Cell viability test

Cellular viability was analyzed using resazurin dye to measure the metabolic capacity of cells, which is an indicator of cell viability, using the CellTiter-Blue® assay (Promega). After an incubation period under the above-described stress conditions, CellTiter-Blue® reagent was added to the cell culture following the protocol described by the manufacturer. Fluorescence intensity was then quantified using a microplate reader with an excitation wavelength of 560 nm and an emission wavelength of 590 nm (Infinite M1000, Tecan, Lyon, France). Fluorescence values were then normalized with respect to control cells considered as 100% viable.

Enzyme-linked immunosorbent assay

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for human CCL-2 were performed using the commercial DuoSet ELISA Development kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). After the incubation period under different stress conditions, cellular supernatants were collected, centrifuged to remove potential cellular fragments, and were stored at -80°C. ELISAs were performed on supernatants according to the manufacturer's protocols. Absorbance was read at 450 nm using a microplate reader (Infinite M1000, Tecan) with a reference wavelength of 570 nm

Immunostaining

Cells were grown on round sterile cover glasses (diameter, 14 mm; Menzel GmbH, Braunschweig, Germany). After the incubation period under different stress conditions, the cells were washed and fixed in 4% paraformaldehyde-PBS (Sigma-Aldrich). They were then permeabilized in a 0.3% Triton (Triton X-100, Sigma-Aldrich) solution for intracellular staining, followed by a 1% bovine serum albumin (Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) incubation for 30 min and an overnight period with the primary antibody: anti-NFAT5 (goat IgG; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Cells were then incubated for 1 h with the secondary antibody Alexa Fluor 488 rabbit anti-goat (Invitrogen, Life Technologies). Cover glasses were then mounted with Mountant PermaFluor® (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) before observation with an epifluorescence microscope (Leica DM6000B, Rueil-Malmaison, France).

RNA extraction, reverse transcription, and quantitative real-time PCR

After the incubation period under different stress conditions, the cells were washed and lysed, and their total RNA was extracted using a NucleoSpin

RNA II extraction kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). RNA content was measured using a NanoDrop detector (ND-1000 spectrophotometer) and cDNA was synthesized from equal amounts of RNA using Multiscribe reverse transcriptase (TaqMan Reverse Transcription Reagents, Applied Biosystems, Life Technologies). Concentrations of each sample were adjusted to 5 ng/μL of cDNA. The reaction mixture containing 25 ng of cDNA per well was preheated at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles (95°C/15 s and 60°C/1 min). Each assay was normalized by amplifying the housekeeping cDNA GAPDH (ID Hs9999905). Target cDNA was amplified using the 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Life Technologies) with assays-on-demand primers for human CCL2 (Hs00234140) and NFAT5 (Hs00232437) (Applied Biosystems, Life Technologies). Changes in mRNA expression were calculated according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (CT, cycle threshold), with $\Delta CT = CT_{\text{target}} - CT_{\text{gapdh}}$ and $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{stimulated}} - \Delta CT_{\text{control}}$.

Statistical analyses

All experiments were performed at least three times. Their conditions were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparison test, or two-way ANOVA followed by Sidak's or Tukey's multiple comparison test (GraphPad, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Only p -values < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Hyperosmolar conditions, from 450 or 500 mOsM, induced cell death in an osmo-dependent manner, CCL2 secretion and gene expression, and NFAT5 gene expression and translocation in conjunctiva-derived cells (Figure 1).

. Cell death

After 24-h treatments, conjunctival cellular viability decreased as soon as the 500-mOsM hyperosmolar condition reached 84% of the control ($p \leq 0.001$) (Figure 1A). Higher hyperosmolar conditions, 550 and 600 mOsM, decreased viability even further, to values of 71 and 52%, respectively ($p \leq 0.0001$).

. CCL2 secretion

Hyperosmolar conditions (500, 550 or 600 mOsM) applied for 24 h induced a significant secretion of CCL2 in supernatants by conjunctiva-derived cells (235, 220, 148 pg/mL, respectively) ($p \leq 0.01$ or $p \leq 0.05$ compared to control cells at 3 pg/mL of CCL2 in supernatants), but no effect was detected for 400- and 450-mOsM conditions (Figure 1B).

. CCL2 gene expression

CCL2 mRNA expression significantly increased in HO 450 mOsM, reaching a relative expression of 12.6 compared to the 340-mOsM control after 4 h

($p \leq 0.001$) (Figure 1C). This relative fold expression was also significantly higher than the control, in 500- and 550-mOsM conditions (13.4 and 8.8, respectively). Neither the highest (600 mOsM) nor the lowest (400 mOsM) HO tested modified CCL2 mRNA expression compared to the control medium.

. NFAT5 gene expression and nuclear translocation

Four hours in hypertonic conditions at 450 and 500 mOsM induced an increase in NFAT5 gene expression 2.7- and 3.1-fold, respectively, compared to the 340-mOsM condition ($p \leq 0.01$ and $p \leq 0.0001$, respectively) (Figure 1D). The immunostaining of NFAT5 showed the presence of NFAT5 both in the cytoplasm and the nuclei for control cells in 340 mOsM with a fine diffuse fluorescent staining (Figure 1E). Cells in hyperosmotic conditions of 500 mOsM for 24 h displayed an intense fluorescent staining in the nuclei, indicating the nuclear translocation of this transcription factor.

Hyperosmolar condition of 500 mOsM induced cell death, secretion and mRNA expression of CCL2, and NFAT5 gene expression in conjunctiva-derived cells in a time-dependent manner (Figure 2).

. Cell death

Conjunctival cells in a 500-mOsM medium started to significantly decrease their viability only after 9 h (88% viability) (Figure 2A). The viability continued to decrease until 24 h of stress.

. CCL2 secretion

Similarly, CCL2 secretion significantly increased after 9 h in 500 mOsM (1 pg/mL vs 52 pg/mL) ($p \leq 0.05$) (Figure 2B). CCL2 secretion increased further to concentrations of 98 pg/mL, 180 pg/mL and 235 mg/mL after 12, 18 and 24 h of hyperosmolar treatment ($p \leq 0.0001$ compared to control cells).

. CCL2 gene expression

CCL2 gene expression was also enhanced by the 500-mOsM medium with CCL2 mRNA expression increasing 14-fold compared to the 340-mOsM control after only 4 h in hyperosmolar conditions (Figure 2C). The mRNA expression increased 32-fold after 6 h and 58-fold after 24 h ($p \leq 0.0001$ for both conditions).

. NFAT5 gene expression

NFAT5 gene expression increased 3.1-fold compared to control cells after 4 h in hyperosmolar conditions ($p \leq 0.0001$). NFAT5 mRNA expression significantly increased 2.4-fold and 2.0-fold following 6 and 24 h of treatment, respectively (Figure 2D).

NFAT5 siRNA increased HO-induced cell death and inhibited HO-induced CCL2 secretion and gene expression in conjunctiva-derived cells (Figure 3).

. Cell death

The cell viability test did not reveal any toxic effect when using NFAT5 siRNA versus control siRNA in basal conditions of 340 mOsM (Figure 3A). However, in 500-mOsM hyperosmolar medium, the viability of cells treated with NFAT5 siRNA was significantly lower than cells treated with control siRNA (64% versus 79%).

. CCL2 secretion

Concerning the CCL2 secretion in 340 mOsM, control and NFAT5 siRNAs did not induce significantly different effects, with a low level of CCL2 in supernatant (37 and 16 pg/mL, respectively) (Figure 3B). In hyperosmolar conditions, adding NFAT5 siRNA induced a complete inhibition of HO-induced CCL2 secretion: HO induced a CCL2 concentration of 356 pg/mL in supernatant of cells treated with control siRNA and CCL2 concentration reached 32 pg/mL with NFAT5 siRNA ($p \leq 0.0001$). This low concentration did not significantly differ from that observed with NFAT5 siRNA in 340-mOsM conditions equal to 37 pg/mL (statistical analysis not shown).

. CCL2 gene expression

The same inhibition profile was observed with CCL2 gene expression. The CCL2 mRNA expression with control siRNA increased 14.3-fold in 500-mOsM conditions compared to 340-mOsM conditions (Figure 3C). Treating cells with NFAT5 siRNA reduced this CCL2 mRNA expression to a value similar to those observed in basal conditions (0.4 vs 0.5).

. NFAT5 gene expression

The specificity of the NFAT5 siRNA used was confirmed by RT-qPCR of NFAT5 (Figure 3D). Treating cells with NFAT5 siRNA significantly reduced NFAT5 mRNA expression compared to cells treated with control siRNA (0.3 vs 1.0 for 340 mOsM and 0.7 vs 2.0 for 500 mOsM).

The lack of toxicity of siRNAs was also verified using the CellTiter-Blue viability test. It showed that control siRNA and NFAT5 siRNA had no effect on the viability of conjunctiva-derived cells compared to cells without siRNA in classic medium (data not shown).

Effects of a p38 inhibitor (SB203580), a JNK inhibitor (SP600125), a MEK/ERK inhibitor (U0126) and a NFkB inhibitor (PDTC) on HO-induced CCL2 secretion, and CCL2 and NFAT5 gene expression in conjunctiva-derived cells (Figure 4).

. CCL2 secretion

In hyperosmolar 500-mOsM conditions for 24 h, the control DMSO 0.1% induced CCL2 secretion in

supernatants (257 pg/mL) (Figure 4A). This secretion significantly decreased for cells pretreated with the inhibitors SB203580, SP600125 and PDTC (162, 89, 130 pg/mL, respectively; $p \leq 0.0001$ for the three conditions). Treating cells with U0126 had no effect on this secretion.

. CCL2 gene expression

The same CCL2 mRNA inhibition profile was observed in hyperosmolar conditions following addition of the inhibitors SB203580, SP600125 and PDTC with a 7.4-, 11.3- and 3.5-fold mRNA increase, respectively, compared to the 18.4-fold increase for DMSO (Figure 4B). As observed during CCL2 secretion assays, U0126 had no effect on HO-induced CCL2 mRNA expression.

Under 340-mOsM basal conditions, the compounds tested had no effect on either the production of CCL2 by conjunctival cells or its gene expression.

. NFAT5 gene expression

Treating cells with PDTC increased NFAT5 gene expression 1.9-fold under basal 340-mOsM conditions (Figure 4C). A 3.0-fold increase in NFAT5 expression was recorded under hyperosmolar conditions containing DMSO. NFAT5 expression in 500-mOsM conditions increased more moderately when SB203580 and PDTC were added to medium (2.1- and 1.7-fold increase, respectively) contrary to SP600125 and U0126, which had no effect at all. None of the compounds tested had a negative effect on cellular viability compared to their respective control conditions: DMSO 0.1% in 340 mOsM or in 500 mOsM (data not shown).

Effects of CsA, Dex and Dox on HO-induced CCL2 secretion as well as CCL2 and NFAT5 gene expressions in conjunctiva-derived cells (Figure 5).

. CCL2 secretion and gene expression

After 24 h in 500-mOsM conditions, CCL2 secretion with control DMSO 0.1% reached 250 pg/mL, whereas after 4 h, CCL2 mRNA expression increased 12.2-fold (Figure 5A and B). Both these effects were significantly inhibited in a concentration-dependent way by CsA and Dex. CsA 1 and 10 $\mu\text{g/mL}$ decreased CCL2 levels to 193 and 144 pg/mL, respectively ($p \leq 0.0001$ compared to DMSO), and lowered the increase in CCL2 expression to 10.0-fold and 8.6-fold, respectively. The lowest dose tested, 0.1 $\mu\text{g/mL}$, had no observable impact on CCL2 levels. The lowest dose of Dex tested (10⁻¹⁰M) also had no effect on CCL2 induction, but Dex 10⁻⁸ and 10⁻⁶M had a significant inhibitory effect on CCL2 secretion (145 and 114 pg/mL, respectively, $p \leq 0.0001$ compared to DMSO) and on CCL2 mRNA expression (increasing it 6.7-fold and 5.7-fold, respectively, $p \leq 0.0001$ compared to DMSO) in 500-mOsM

conditions. In contrast, Dox had no inhibitory effect on CCL2 secretion induced by HO and even led to a significant increase in HO-induced CCL2 gene expression compared to DMSO (15.6-fold, $p \leq 0.0001$).

. *NFAT5 gene expression*

HO conditions increased NFAT5 mRNA expression 3.2-fold. This HO-induced increase was significantly inhibited by Dex 10⁻⁸ and 10⁻⁶M (2.2-fold and 2.0-fold, respectively) (Figure 5C). CsA and Dox induced no significant effect on NFAT5 gene expression. Mixing Dex and CsA induced no effect that differed significantly from each of the conditions alone (statistics not shown; two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test). Under 340-mOsM conditions, none of the compounds tested had any effect on the production and gene expression of CCL2, or on NFAT5 gene expression by conjunctival cells. None of the compounds tested affected cellular viability compared to DMSO 0.1% conditions under 340 mOsM or 500 mOsM, respectively (data not shown).

DISCUSSION

Despite its worldwide high prevalence and its significant impact on everyday life for patients, DED actually has few symptomatic and curative treatments. It is therefore important to improve the understanding of the pathogenesis mechanisms that underlie this disease with the ultimate goal of developing new targeted therapeutic strategies. The pathophysiology of DED is in part studied through *in vitro* experiments that analyze the behavior of ocular surface cells under dry eye stress.

Among these *in vitro* studies, those using the hyperosmolar model of dry eye predominantly focus on corneal cells, although the conjunctiva is also an important actor on the ocular surface. Indeed, this ocular tissue covers the major part of the ocular surface. This tissue, highly vascularized and containing immune cells, is the site where inflammatory reactions take place. Moreover, conjunctival cells themselves are able to secrete inflammatory cytokines and to participate in inflammatory processes(46). Therefore, we used a cell line derived from conjunctiva in a hyperosmolar NaCl-induced *in vitro* model of dry eye. We wished to characterize the mechanism of the induction of the CCL2 pro-inflammatory chemokine through cellular pathways, such as MAPK and NF κ B, with a focus on the NFAT5 transcription factor. We also investigated the effects of different drugs used in DED, among which CsA on CCL2 and NFAT5 induction. We demonstrated that conjunctiva-derived cells respond to hyperosmotic stress by inducing gene

expression and secretion of the chemokine CCL2, just as corneal cells or other cell types do (47,48). This induction is dependent on the osmolarity level up to high osmolarities such as 550 or 600 mOsM. In a higher range of osmolarity, this induction decreases, probably due to the substantial cell death that occurs in this condition (50% cell death for 24 h in 600 mOsM). The lowest osmolarity tested that induced both secretion and gene expression of CCL2 was 500 mOsM, a classical osmolarity level used in previous studies on ocular surface cells (49). HO was induced in conjunctiva-derived cells, an increase in CCL2 mRNA expression as early as 4 h, whereas its secretion started after 9 h. This delay between gene expression and secretion assumes that HO induces CCL2 by stimulating its gene expression, consequently leading to its secretion 5 h later. These results tend to show that there is no preformed stock of CCL2 in these cells. The CCL2 secretion and gene expression continue to be stimulated by HO even after 24 h of stress. Thus, these results support the hypothesis that conjunctival cells are able to secrete this pro-inflammatory chemokine and could therefore be responsible for the attraction of immune cells, namely monocytes/macrophages that will further nourish the inflammatory process on the ocular surface. Blocking this inflammatory pathway that results in CCL2 secretion could then have a potential therapeutic interest, as Goyal et al. have demonstrated in an *in vivo* model of dry eye. Indeed, animals with dry eye receiving CCR2 antagonist presented a decrease in corneal alterations (corneal fluorescein staining) and in pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β on the ocular surface, confirming the importance of CCL2 in the pathology.

We showed in this hyperosmolar model that CsA displays a concentration-dependent inhibitory effect on the HO-induced CCL2 production by conjunctival cells. This inhibitory effect was also observed with Dex, an effect reported in a previous study on corneal cells (28). Conversely, Dox never inhibited CCL2 in this model and even induced an elevation on CCL2 gene expression. Reported inhibitory effects of anti-inflammatory drugs on CCL2 induction are various. Regarding only studies on ocular cells, Dex was reported to inhibit CCL2 induced by IL-1 β on retinal cells (50) but not on corneal cells (44). In retinal epithelial cells, CsA has inhibited the CCL2 induction caused by TNF α but not by IL-1 β (50). In lung epithelial cells, Dox inhibited CCL2 production induced by a mix of cytokines (51). Since there is currently no data available on the effect of CsA on HO-induced CCL2 secretion on the ocular surface, nor on Dox, the results reported herein are innovative and provide

new information about the anti-inflammatory mechanism of these molecules. In addition, we observed that although having different mechanisms of action, CsA and Dex inhibit CCL2 induction probably through the same molecular pathway, since combining these two molecules did not result in a stronger inhibitory effect. It is noteworthy that the drug concentrations tested are lower than those actually present in eyedrops. The CCL2 induction pathway could represent an advantageous therapeutic target as the anti-inflammatory effect of CsA and Dex observed in patients could partly be explained by its inhibition. It is therefore important to understand which molecular actors of the HO-induced molecular pathway lead to CCL2 secretion. Three MAPKs are identified in mammalian cells and are involved in intracellular signaling pathways: p38, JNK and ERK. MAPKs are serine and threonine kinases that are activated by phosphorylation. They are cell responses to the environment that are important to control and they regulate gene expression, mitosis, proliferation and apoptosis. All three types of MAPKs are activated by hyperosmolarity in several types of mammalian cells (32,52,53). The transcription factor NF κ B has also been identified as an important molecule activated in response to hyperosmolarity in several cell types (54,55). NF κ B is an important regulator of many physiological processes such as inflammation, immunity, cell proliferation, differentiation and apoptosis. Previous studies on corneal cells showed that NaCl-induced HO activates p38 (56,57), JNK (17,20,57–59) and ERK (17) as well as NF κ B (60). Moreover, a recent study showed that HO activates JNK on primary conjunctival cells as well (61). In our experimental conditions, we demonstrated that CCL2 secretion and gene expression induced by HO are related to p38, JNK and NF κ B and not to ERK. These results confirmed other studies conducted on corneal cells, which found that some effects of HO were directly linked to these pathways: induction of MMP (20), apoptosis (17) and induction of cytokine secretion as IL-1 β (45). These pathways are then potential factors to consider for developing new drugs for DED and they are known to be repressed by CsA and Dex, including in ocular cell studies (28,62,63).

Hyperosmolarity is known to activate the NFAT5 transcription factor, today mostly studied to characterize its effects on different cell types (64). NFAT5 plays a key role in osmoprotection by binding to the osmotic response element (ORE)/TonE of genes. These genes encode transporters and enzymes leading to cellular accumulation of compatible osmolytes, thus promoting cell survival and protecting cells from

the deleterious effects of shrinkage. Besides this fundamental osmoprotective role, it also has a wider range of functions, such as inflammatory cytokine production (65,66). In our experiments, we observed that HO induces NFAT5 translocation and NFAT5 mRNA expression with a maximum of gene induction after 4 h of stimulation. We then demonstrated with siRNA experiments that the CCL2 secretion and mRNA expression induced by hyperosmolar conditions are entirely mediated by NFAT5. Indeed, HO-induced CCL2 was totally inhibited after NFAT5 neutralization. It was also shown by Lee et al. that in limbal cells the induction of IL-1 β and TNF- α by HO was related to NFAT5 (35). Moreover, a relation between HO, CCL2 and NFAT5 has been recently reported in rat kidney cells and mesothelial cells (32,33). In the present study, we demonstrated for the first time in conjunctiva-derived cells the major role played by NFAT5 on the pro-inflammatory cytokine CCL2 induction by HO and also confirmed the protective effect of NFAT5 on cell survival under hyperosmolar stress. These new findings on another ocular surface cell highlighted the potentially crucial role of NFAT5 in dry eye syndrome and the necessity to further investigate its mechanisms and effects in ocular cells. We also determined that the HO-induced NFAT5 expression was linked to p38 activity and that NF κ B has an important dual role in NFAT5 expression; indeed, NF κ B upregulates NFAT5 in basal conditions and downregulates it in hyperosmolar conditions. Another study reported that NFAT5 modulates NF κ B activity in hyperosmolar conditions (67), confirming the important interaction between the two actors activated by hyperosmolar stress. Finally, we showed that neither CsA nor Dox has an effect on HO-induced NFAT5 mRNA expression. Other studies have confirmed this lack of effect of CsA on NFAT5 expression on corneal or collecting duct cells (68,69). In our model, Dex decreased NFAT5 mRNA expression due to HO, and this action could explain the inhibitory effect of Dex on HO-induced CCL2.

Finally, the important role played by conjunctival cells is confirmed in their important role in ocular surface defense. They are able to secrete pro-inflammatory mediators that could participate in the vicious circle of DED by interfering with the inflammatory process stimulated by tear film hyperosmolarity. The inflammatory cellular pathway of NFAT5 translocation, a typical feature of hyperosmolar stress, leading to CCL2 secretion through other factors such as MAPKs and NF κ B, constitutes a biological cascade with potentially promising new targets of interest for DED therapy.

REFERENCES

1. DEWS. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf.* 2007; 5(2):75–92.
2. Goto E, Yagi Y, Matsumoto Y, Tsubota K. Impaired functional visual acuity of dry eye patients. *Am J Ophthalmol.* 2002; 133(2):181–6.
3. Bron AJ, Tomlinson A, Foulks GN, Pepose JS, Baudouin C, Geerling G, et al. Rethinking dry eye disease: a perspective on clinical implications. *Ocul Surf.* 2014; 12(2 Suppl):S1–31.
4. Miljanović B, Dana R, Sullivan D a., Schaumberg D a. Impact of Dry Eye Syndrome on Vision-Related Quality of Life. *Am J Ophthalmol.* 2007; 143(3):409–15.
5. Labbé A, Wang YX, Jie Y, Baudouin C, Jonas JB, Xu L. Dry eye disease, dry eye symptoms and depression: the Beijing Eye Study. *Br J Ophthalmol.* 2013; 97(11):1399–403.
6. Baudouin C. A new approach for better comprehension of diseases of the ocular surface. *J Fr Ophtalmol.* 2007; 30(3):239–46.
7. Baudouin C, Aragona P, Messmer EM, Tomlinson A, Calonge M, Boboridis KG, et al. Role of Hyperosmolarity in the Pathogenesis and Management of Dry Eye Disease: Proceedings of the OCEAN Group Meeting. *Ocul Surf.* 2013; 11(4):246–58.
8. Liu H, Begley C, Chen M, Bradley A, Bonanno J, McNamara NA, et al. A link between tear instability and hyperosmolarity in dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(8):3671–9.
9. Stern ME, Pflugfelder SC. Inflammation in dry eye. *Ocul Surf.* 2004; 2(2):124–30.
10. Barabino S, Montaldo E, Solignani F, Valente C, Mingari MC, Rolando M. Immune response in the conjunctival epithelium of patients with dry eye. *Exp Eye Res. Elsevier Ltd;* 2010; 91(4):524–9.
11. Massingale ML, Li X, Vallabhajosyula M, Chen D, Wei Y, Asbell P a. Analysis of inflammatory cytokines in the tears of dry eye patients. *Cornea.* 2009; 28(9):1023–7.
12. Yoon K-C, Jeong I-Y, Park Y-G, Yang S-Y. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in tears of patients with dry eye syndrome. *Cornea.* 2007; 26(4):431–7.
13. Brignole F, Pisella P, Goldschild M, Jean MD Saint, Goguel A, Baudouin C. Flow Cytometric Analysis of Inflammatory Markers in Conjunctival Epithelial Cells of Patients with Dry Eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000; 41(6):1356–63.
14. Kunert KS, Tisdale AS, Gipson IK. Goblet cell numbers and epithelial proliferation in the conjunctiva of patients with dry eye syndrome treated with cyclosporine. *Arch Ophthalmol.* 2002;120(3):330–7.
15. Lam H, Bleiden L, De Paiva CS, William F, E SM, Pflugfelder SC. Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome. *Am J Ophthalmol.* 2009; 147(2):1–19.
16. Clouzeau C, Godefroy D, Riancho L, Rostène W, Baudouin C, Brignole-Baudouin F. Hyperosmolarity potentiates toxic effects of benzalkonium chloride on conjunctival epithelial cells in vitro. *Mol Vis.* 2012; 18:851–63.
17. Luo L, Li D-Q, Pflugfelder SC. Hyperosmolarity-induced apoptosis in human corneal epithelial cells is mediated by cytochrome c and MAPK pathways. *Cornea.* 2007; 26(4):452–60.
18. Chen Y, Li M, Li B, Wang W, Lin A, Sheng M. Effect of reactive oxygen species generation in rabbit corneal epithelial cells on inflammatory and apoptotic signaling pathways in the presence of high osmotic pressure. *PLoS One.* 2013;8(8):e72900.
19. Deng R, Hua X, Li J, Chi W, Zhang Z, Lu F, et al. Oxidative stress markers induced by hyperosmolarity in primary human corneal epithelial cells. *PLoS One.* 2015 Jan;10(5):e0126561.
20. Li D-Q, Chen Z, Song XJ, Luo L, Pflugfelder SC. Stimulation of matrix metalloproteinases by hyperosmolarity via a JNK pathway in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45(12):4302–11.
21. Li D, Luo L, Chen Z, Kim H-S, Song XJ, Pflugfelder SC. JNK and ERK MAP kinases mediate induction of IL-1 β , TNF- α and IL-8 following hyperosmolar stress in human limbal epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2006;82(4):588–96.
22. Pan Z, Wang Z, Yang H, Zhang F, Reinach PS. TRPV1 activation is required for hypertonicity-stimulated inflammatory cytokine release in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52(1):485–93.
23. Luo L, Li D-Q, Doshi A, Farley W, Corrales RM, Pflugfelder SC. Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signaling pathways on the ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45(12):4293–301.
24. Luo L, Li D-Q, Corrales RM, Pflugfelder SC. Hyperosmolar saline is a proinflammatory stress on the mouse ocular surface. *Eye Contact Lens.* 2005; 31(5):186–93.
25. Zhu L, Shen J, Zhang C, Park CY, Kohanim S, Yew M, et al. Inflammatory cytokine expression on the ocular surface in the Botulium toxin B induced murine dry eye model. *Mol Vis.* 2009;15:250–8.
26. Hua X, Su Z, Deng R, Lin J, Li D-Q, Pflugfelder SC. Effects of L-Carnitine, Erythritol and Betaine on

- Pro-inflammatory Markers in Primary Human Corneal Epithelial Cells Exposed to Hyperosmotic Stress. *Curr Eye Res.* 2015; 40(7):657–67.
27. Cavet ME, Harrington KL, Vollmer TR, Ward KW, Zhang J-Z. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of the green tea polyphenol epigallocatechin gallate in human corneal epithelial cells. *Mol Vis.* 2011; 17:533–42.
28. Cavet ME, Harrington KL, Ward KW, Zhang J-Z. Mapracorat, a novel selective glucocorticoid receptor agonist, inhibits hyperosmolar-induced cytokine release and MAPK pathways in human corneal epithelial cells. *Mol Vis.* 2010;16:1791–800.
29. Chen L, Li J, Guo T, Ghosh S, Koh SK, Tian D, et al. Global Metabonomic and Proteomic Analysis of Human Conjunctival Epithelial Cells (IOBA-NHC) in Response to Hyperosmotic Stress. *J Proteome Res.* 2015; 19.
30. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interf cytokine Res.* 2009; 29(6):313–26.
31. Goyal S, Chauhan SK, Zhang Q, Dana R. Amelioration of Murine Dry Eye Disease by Topical Antagonist to Chemokine Receptor 2. *Arch Ophthalmol.* 2009; 127(7):882–7.
32. Kojima R, Taniguchi H, Tsuzuki A, Nakamura K, Sakakura Y, Ito M. Hypertonicity-induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 through a novel cis-acting element and MAPK signaling pathways. *J Immunol.* 2010; 184(9):5253–62.
33. Küper C, Beck F-X, Neuhofer W. NFAT5 contributes to osmolality-induced MCP-1 expression in mesothelial cells. *Mediators Inflamm.* 2012; 2012:513015.
34. Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(5):2538–42.
35. Lee JH, Kim M, Im YS, Choi W, Byeon SH, Lee HK. NFAT5 induction and its role in hyperosmolar stressed human limbal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49(5):1827–35.
36. Tsubota K, Fujihara T, Saito K, Takeuchi T. Conjunctival epithelium expression of HLA-DR in dry eye patients. *Ophthalmologica.* 1999; 213(1):16–9.
37. Baudouin C, Haouat N, Brignole F, Bayle J, Gastaud P. Immunopathological findings in conjunctival cells using immunofluorescence staining of impression cytology specimens. *Br J Ophthalmol.* 1992; 76(9):545–9.
38. Baudouin C, Liang H, Bremond-Gignac D, Hamard P, Hreiche R, Creuzot-Garcher C, et al. 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.* 2005; 116(3):614–9.
39. Contreras-Ruiz L, Regenfuss B, Mir FA, Kearns J, Masli S. Conjunctival inflammation in thrombospondin-1 deficient mouse model of Sjögren’s syndrome. *PLoS One.* 2013 Jan;8(9):e75937.
40. Xiao B, Wang Y, Reinach PS, Ren Y, Li J, Hua S, et al. Dynamic Ocular Surface and Lacrimal Gland Changes Induced in Experimental Murine Dry Eye. *PLoS One.* 2015;10(1):e0115333.
41. Brasnu E, Brignole-Baudouin F, Riancho L, Warnet J-M, Baudouin C. Comparative study on the cytotoxic effects of benzalkonium chloride on the Wong-Kilbourne derivative of Chang conjunctival and IOBA-NHC cell lines. *Mol Vis.* 2008;14:394–402.
42. Ramirez-miranda A, Nakatsu MN, Zareghanavati S, Nguyen C V, Deng SX. Keratin 13 is a more specific marker of conjunctival epithelium than keratin 19. *Mol Vis.* 2011; 17:1652–61.
43. Sullivan BD, Whitmer D, Nichols KK, Tomlinson A, Foulks GN, Geerling G, et al. An objective approach to dry eye disease severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51(12):6125–30.
44. Djalilian AR, Nagineni CN, Mahesh SP, Smith J a, Nussenblatt RB, Hooks JJ. Inhibition of inflammatory cytokine production in human corneal cells by dexamethasone, but not cyclosporin. *Cornea.* 2006; 25(6):709–14.
45. Chen M, Hu D-N, Pan Z, Lu C-W, Xue C-Y, Aass I. Curcumin protects against hyperosmoticity-induced IL-1beta elevation in human corneal epithelial cell via MAPK pathways. *Exp Eye Res.* 2010; 90(3):437–43.
46. Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, Afonso A, Monroy D. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögren’s syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res.* 1999;19(3):201–11.
47. Hua X, Deng R, Li J, Chi W, Su Z, Lin J, et al. Protective Effects of L-Carnitine Against Oxidative Injury by Hyperosmolarity in Human Corneal Epithelial Cells. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2015;56(9):5503.
48. Matsuo H, Tamura M, Kabashima N, Serino R, Tokunaga M, Shibata T, et al. Prednisolone inhibits hyperosmolarity-induced expression of MCP-1 via NF-kappaB in peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int.* 2006; 69(4):736–46.
49. Narayanan S, Manning J, Proske R, McDermott AM. Effect of Hyperosmolality on β -Defensin Gene Expression by Human Corneal Epithelial Cells. *Cornea.* 2006;25(9):1063–8.
50. Kurtz RM, Elnor VM, Bian ZM, Strieter RM, Kunkel SL, Elnor SG. Dexamethasone and

- cyclosporin A modulation of human retinal pigment epithelial cell monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38(2):436–45.
51. Raza M, Ballering JG, Hayden JM, Robbins RA, Hoyt JC. Doxycycline decreases monocyte chemoattractant protein-1 in human lung epithelial cells. *Exp Lung Res.* 2006; 32(1-2):15–26.
52. Duzgun S a, Rasque H, Kito H, Azuma N, Li W, Basson MD, et al. Mitogen-activated protein phosphorylation in endothelial cells exposed to hyperosmolar conditions. *J Cell Biochem.* 2000; 76(4):567–71.
53. Matsuda S, Kawasaki H, Moriguchi T, Gotoh Y, Nishida E. Activation of protein kinase cascades by osmotic shock. *J Biol Chem.* 1995; 270(21):12781–6.
54. Németh ZH, Deitch E a, Szabó C, Haskó G. Hyperosmotic stress induces nuclear factor-kappaB activation and interleukin-8 production in human intestinal epithelial cells. *Am J Pathol.* 2002; 161(3):987–96.
55. Hao CM, Yull F, Blackwell T, Kömhoff M, Davis LS, Breyer MD. Dehydration activates an NF- κ B-driven, COX2-dependent survival mechanism in renal medullary interstitial cells. *J Clin Invest.* 2000; 106(8):973–82.
56. Wang L, Dai W, Lu L. Hyperosmotic stress-induced corneal epithelial cell death through activation of Polo-like kinase 3 and c-Jun. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(6):3200–6.
57. Corrales RM, Luo L, Chang EY, Pflugfelder SC. Effects of osmoprotectants on hyperosmolar stress in cultured human corneal epithelial cells. *Cornea.* 2008; 27(5):574–9.
58. Chen Z, Tong L, Li Z, Yoon K-C, Qi H, Farley W, et al. Hyperosmolarity-induced cornification of human corneal epithelial cells is regulated by JNK MAPK. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49(2):539–49.
59. Capó-Aponte JE, Wang Z, Bildin VN, Pokorny KS, Reinach PS. Fate of hypertonicity-stressed corneal epithelial cells depends on differential MAPK activation and p38MAPK/Na-K-2Cl cotransporter1 interaction. *Exp Eye Res.* 2007;84(2):361–72.
60. Chang E-J, Im YS, Kay EP, Kim JY, Lee JE, Lee HK. The Role of Nerve Growth Factor in Hyperosmolar Stress Induced Apoptosis. *J Cell Physiol.* 2008;216(1):69–77.
61. Kang S, Ha S, Kim E, Shin J, Kim JY, Tchah H. Effect of Nerve Growth Factor on the In Vitro Induction of Apoptosis of Human Conjunctival Epithelial Cells by Hyperosmolar Stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014; 55(1):535–41.
62. Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology.* 2000; 47(2-3):119–25.
63. Mattila PS, Ullman KS, Fiering S, Emmel E a, McCutcheon M, Crabtree GR, et al. The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *EMBO J.* 1990;9(13):4425–33.
64. Hollborn M, Vogler S, Reichenbach A, Wiedemann P, Bringmann A, Kohen L. Regulation of the hyperosmotic induction of aquaporin 5 and VEGF in retinal pigment epithelial cells: Involvement of NFAT5. *Mol Vis.* 2015;28:360–77.
65. López-Rodríguez C, Antos CL, Shelton JM, Richardson J a, Lin F, Novobrantseva TI, et al. Loss of NFAT5 results in renal atrophy and lack of tonicity-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(8):2392–7.
66. Arambu J, Drews-Elger K, Estrada-Gelonch A, Minguillon J, Morancho B, Santiago V, et al. Regulation of the hypertonic stress response and the other cellular functions by the Rel-like transcription factor NFAT5. *Biochem Pharmacol.* 2006; 72(11):1597–604.
67. Roth I, Leroy V, Martin P, Féraille E, Hasler U. Osmoprotective transcription factor NFAT5/TonEBP modulates nuclear factor-kappaB activity. *Mol Biol Cell.* 2010; 21(19):3459674.
68. Lee JH, Kim JW, Im YS, Seong GJ, Lee HK. Cyclosporine A induces nerve growth factor expression via activation of MAPK p38 and NFAT5. *Cornea.* 2011; 30(10, suppl1):S19–24.
69. Rinschen MM, Klockers J, Pavenstädt H, Neugebauer U, Schlatter E, Edemir B. Different effects of CsA and FK506 on aquaporin-2 abundance in rat primary cultured collecting duct cells. *Pflugers Arch.* 2011;462(4):611–22.

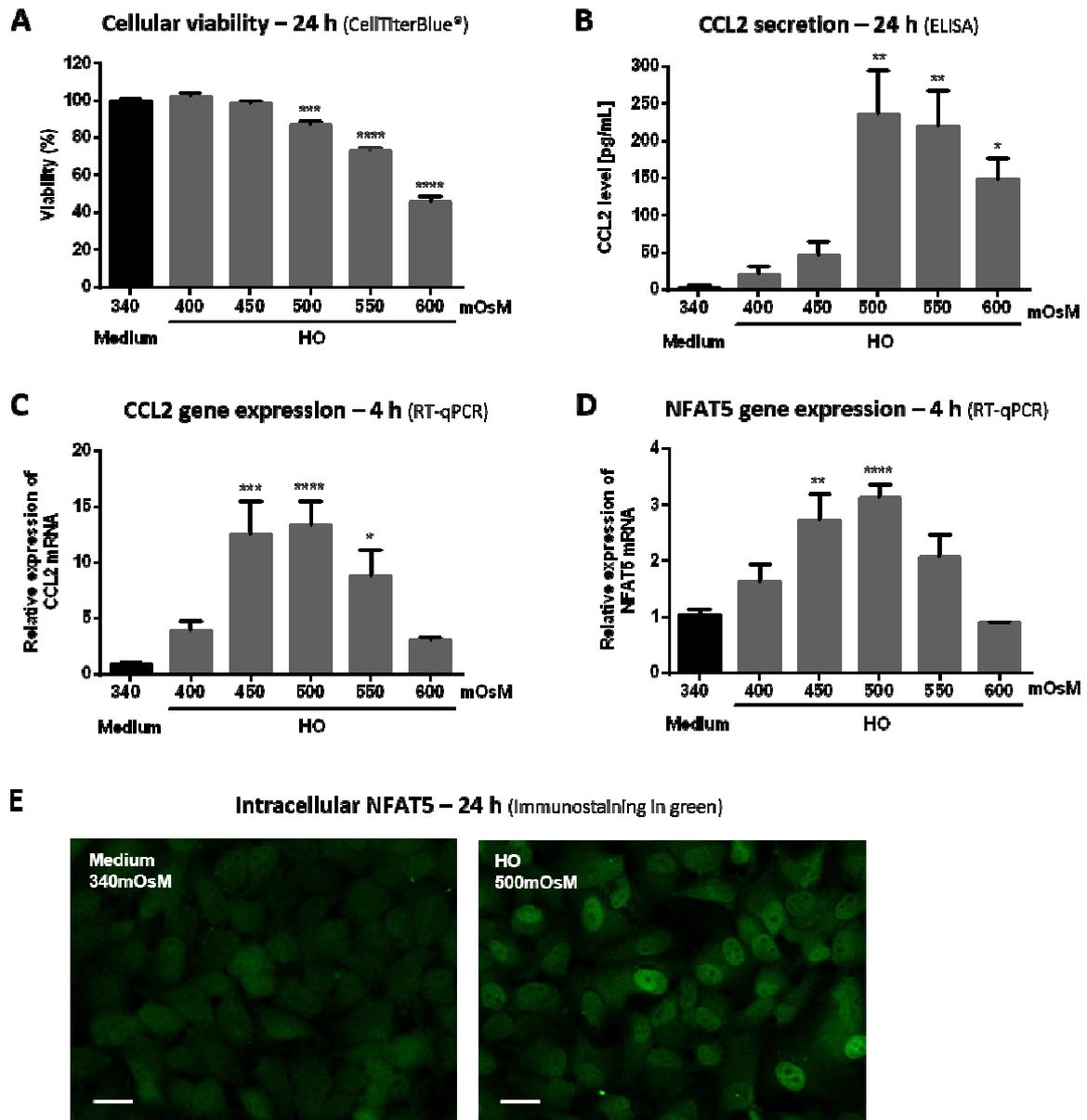


Figure 1. Hyperosmolar conditions, from 450 or 500 mOsM, induced cell death (A) in an osmo-dependent manner, CCL2 secretion (B), CCL2 gene expression (C), and NFAT5 gene expression (D) and NFAT5 translocation (E) in conjunctiva-derived cells. Cells exposed to supplemented medium (340 mOsM) or different hyperosmolar conditions from 400 to 600 mOsM for 24 h were tested for **cellular viability** (A) with CellTiterBlue® assay and **CCL2 secretion** (B) by ELISA, and cells treated for 4 h were lysed for mRNA expression by RT-qPCR to determine the **CCL2 and NFAT5 gene expression** (C, D). Data show mean \pm SEM, $n = 3$ or more. Statistical analysis: one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$, compared to 340 mOsM. Cells exposed to supplemented medium (340 mOsM) or hyperosmolar medium (500 mOsM) for 24 h were analyzed for NFAT5 translocation with **NFAT5 immunofluorescent staining** (E) in green. White scale bar : 20 μ m.

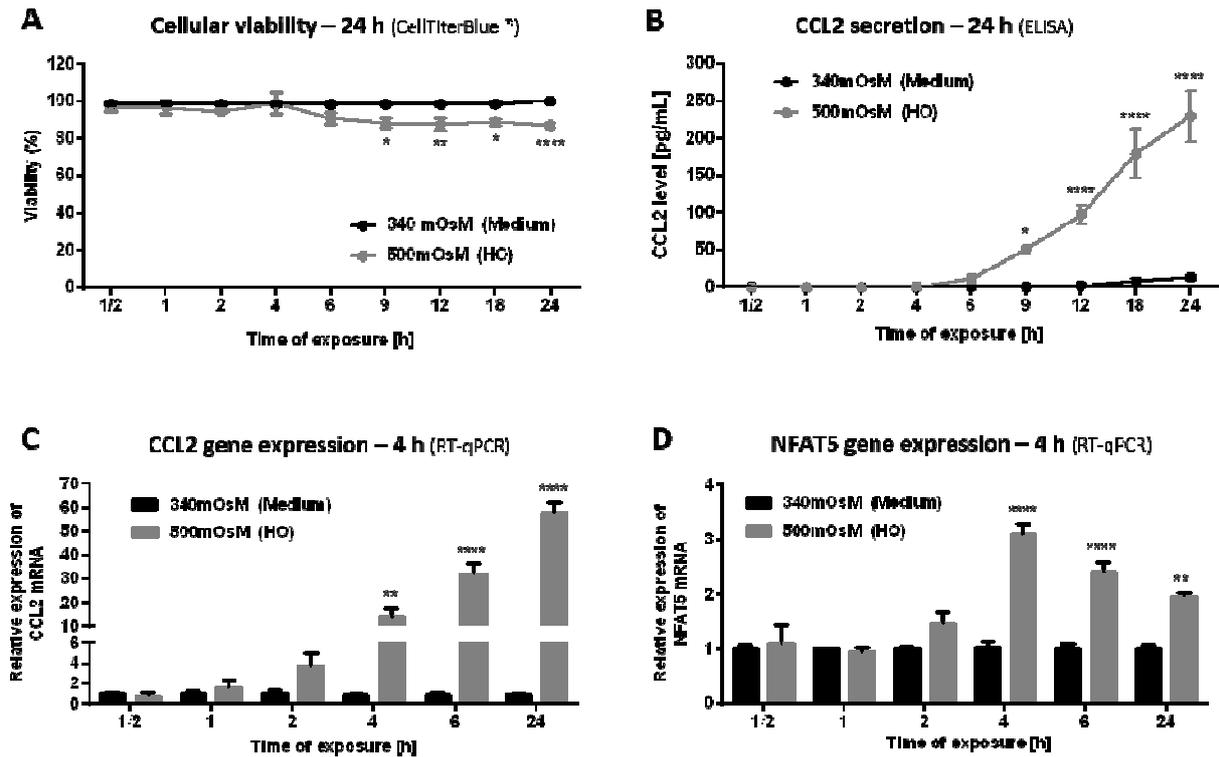


Figure 2. Hyperosmolar condition of 500 mOsm induced cell death, secretion and gene expression of CCL2 and NFAT5 gene expression in conjunctiva-derived cells in a time-dependent manner. Cells exposed to supplemented medium (340 mOsm) or the hyperosmolar condition (500 mOsm) for different times from 30 min to 24 h were tested for **cellular viability (A)** with CellTiter-Blue® assay, **CCL2 secretion (B)** with ELISA and were lysed for mRNA expression using RT-qPCR to determine **CCL2 and NFAT5 gene expression (C, D)**. Data showing mean \pm SEM, $n = 3$ or more. Statistical analysis: two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$, compared to 340 mOsm at the same time.

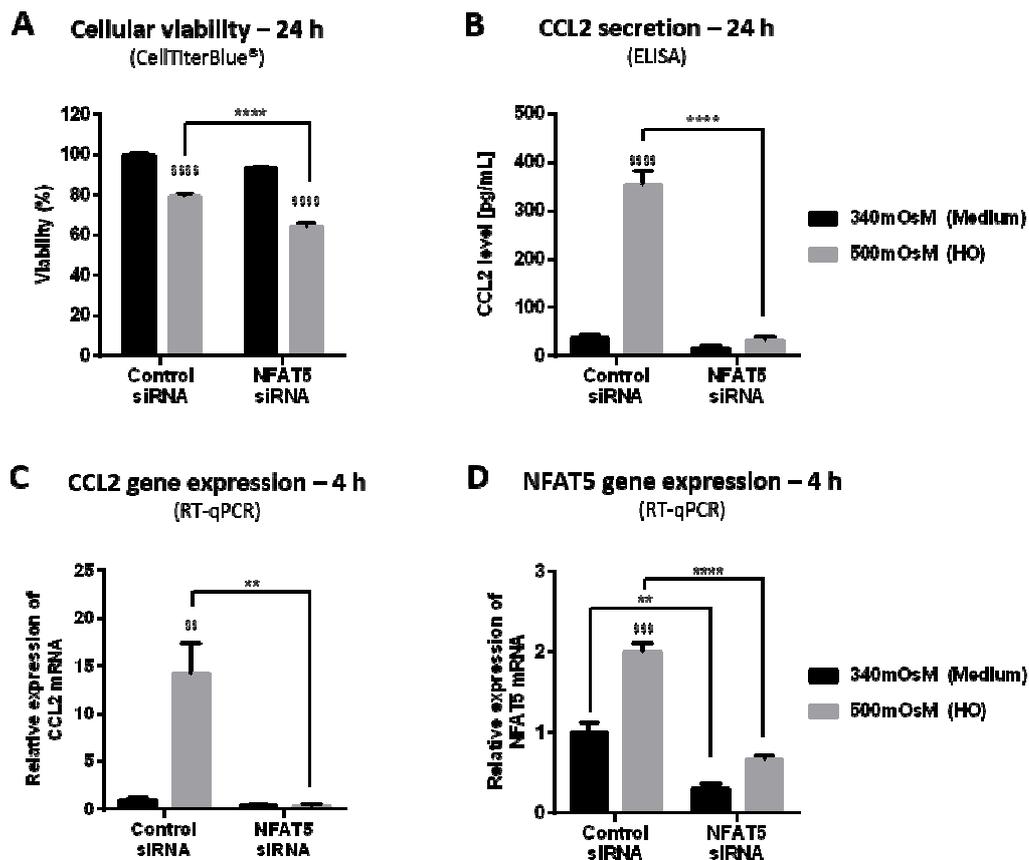


Figure 3. NFAT5 siRNA increased HO-induced cell death and inhibited HO-induced CCL2 secretion and CCL2 and NFAT5 gene expression in conjunctiva-derived cells. Cells treated for 24 h with negative control siRNA or NFAT5 siRNA were then exposed to supplemented medium (340 mOsM) or hyperosmolar condition (500 mOsM). Cells exposed for 24 h were tested for **cellular viability (A)** with CellTiter-Blue® assay, **CCL2 secretion (B)** by ELISA and cells exposed for 4 h were lysed for mRNA expression using RT-qPCR to determine the **CCL2 and NFAT5 gene expression (C, D)**. Data showing mean \pm SEM, $n = 3$ or more. Statistical analysis: two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. § $p \leq 0.05$; §§ $p \leq 0.01$; §§§ $p \leq 0.001$; §§§§ $p \leq 0.0001$, compared to respective 340 mOsM. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$, compared to respective control siRNA.

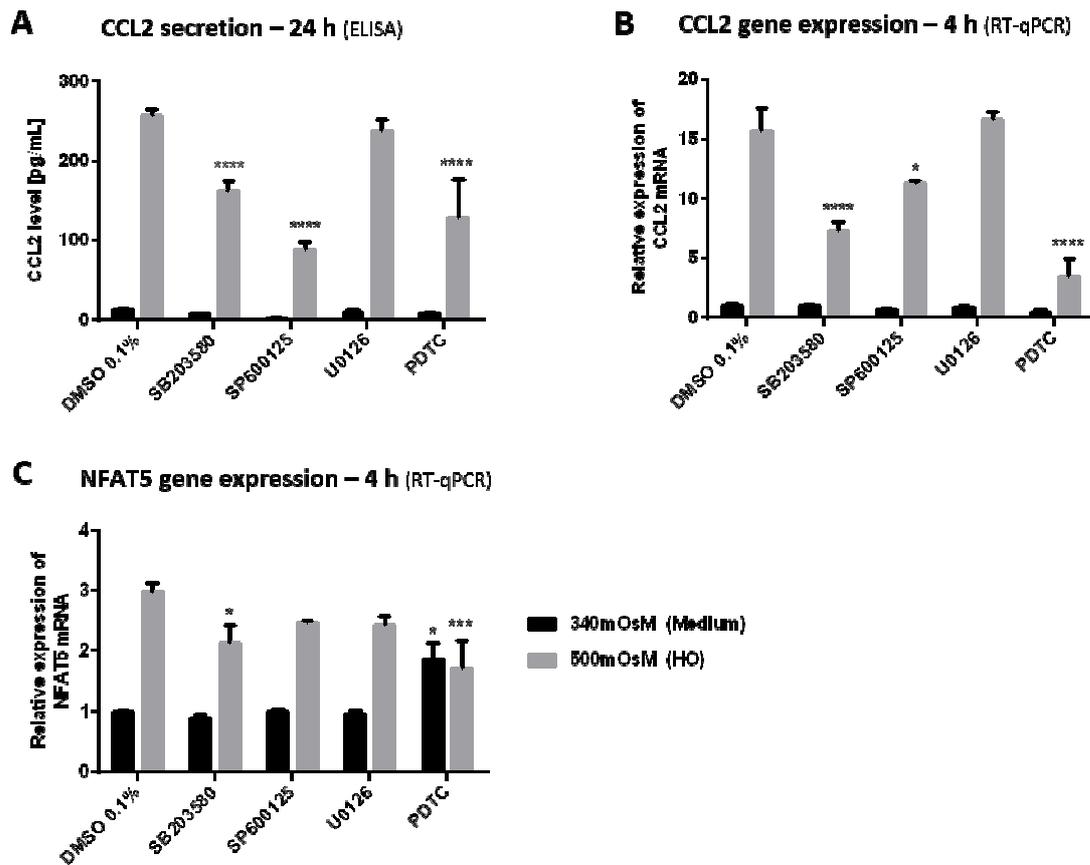


Figure 4. Effects of a p38 inhibitor (SB203580), a JNK inhibitor (SP600125), a MEK/ERK inhibitor (U0126) and a NFκB inhibitor (PDTC) on HO-induced CCL2 secretion and CCL2 and NFAT5 gene expression in conjunctiva-derived cells. Cells were treated for 1 h with DMSO 0.1%, SB203580 10 μM, SP600125 10 μM, U0126 10 μM or PDTC 50 μM before adding supplemented medium 340 mOsM or hyperosmolar medium to reach 500 mOsM. Cells exposed to medium or HO for 24 h were tested for **CCL2 secretion (A)** by ELISA and cells exposed for 4 h were lysed for mRNA expression using RT-qPCR to determine the **CCL2 and NFAT5 gene expression (B, C)**. Data showing mean ± SEM, $n = 3$ or more. Statistical analysis: two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$, compared to respective DMSO 0.1%.

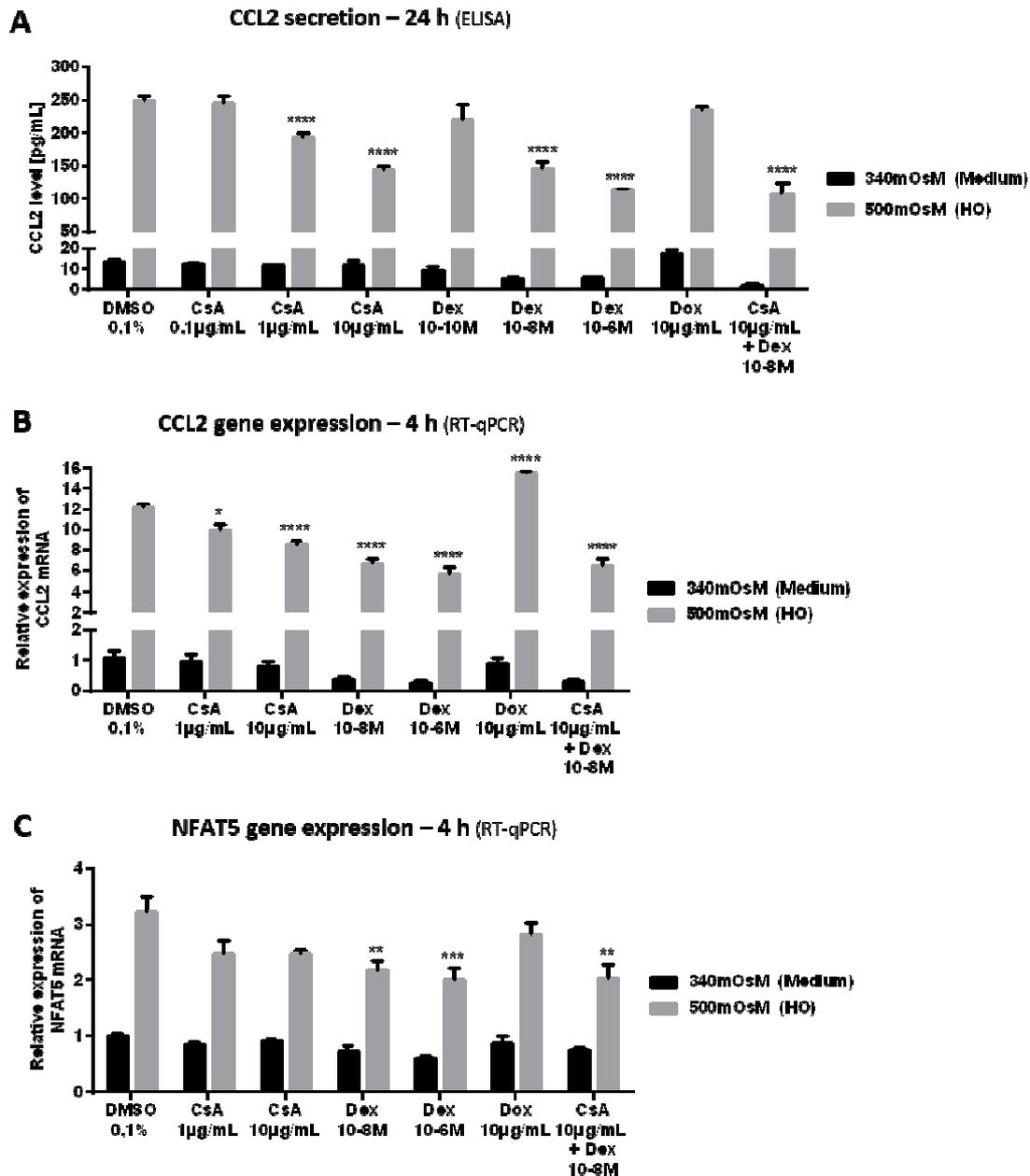


Figure 5. Effects of CsA, Dex and Dox on HO-induced CCL2 secretion and CCL2 and NFAT5 gene expression in conjunctiva-derived cells. Cells were treated for 1 h with DMSO 0.1%, CsA (0.1, 1 and 10 µg/mL), Dex (10^{-10} , 10^{-8} and 10^{-6} M), Dox 10 µg/mL or a mix of CsA 10 µg/mL and Dex 10^{-8} M before adding supplemented medium 340 mOsm or HO to reach 500 mOsm. Cells exposed to medium or HO for 24 h were tested for **CCL2 secretion (A)** by ELISA and cells exposed for 4 h were lysed for mRNA expression using RT-qPCR to determine the **CCL2 and NFAT5 gene expression (B, C)**. Data showing mean \pm SEM, $n = 3$ or more. Statistical analysis: two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$, compared to respective DMSO 0.1%.

2.3. EFFETS DE L'OSMOLARITE SUR L'ACTIVATION DE L'INFLAMMASOME

2.3.1. Introduction

Nous avons observé dans l'étude précédente l'activation de la chimiokine pro-inflammatoire CCL2 dans les conditions hyperosmolaires. Or le processus inflammatoire est un phénomène complexe qui met en jeu de nombreux acteurs et plusieurs voies d'activation particulières ; les effets pro-inflammatoires de l'hyperosmolarité peuvent donc également découler d'autres voies intracellulaires spécifiques. Parmi celles-ci, nous avons étudié la voie de l'inflammasome. Les produits finaux de cette voie d'inflammation sont les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18. L'étude *in vitro* d'IL-1 β dans des modèles de sécheresse oculaire est particulièrement intéressante car cette interleukine a été identifiée à de nombreuses reprises comme induite dans cette pathologie, que ce soit chez les patients ou dans les modèles expérimentaux *in vivo* (294,560). Son importance dans la physiopathologie de la maladie est supposée telle qu'un essai clinique d'un antagoniste des récepteurs d'IL-1, nommé « anakinra » (Kineret®, Amgen Inc.), pour traiter la sécheresse oculaire a été mené et a montré dans une première étude une efficacité sur la correction des altérations épithéliales de la forme dosée à 2,5% (387,599). Cependant, l'étude de phase III n'a pas confirmé ces premiers résultats et son développement dans le traitement de l'œil sec a été abandonné. Récemment, des études ont rapporté une augmentation des divers composants de l'inflammasome dans la conjonctive des patients atteints (299,300) ainsi que dans un modèle *in vivo* de sécheresse oculaire (355).

L'intérêt potentiel d'IL-1 β dans ce modèle d'hyperosmolarité est renforcé par des études sur des cellules cornéennes qui rapportent l'induction de cette interleukine dans ces mêmes conditions (248,299,355,446). Dans une de ces études en particulier, parue en 2015, il est également rapporté l'activation de l'inflammasome NLRP3. Remarquons tout de même que quelques publications sont contradictoires sur ce sujet et n'ont pas réussi à détecter d'induction d'IL-1 β sur ces cellules dans un modèle hyperosmolaire (600,601).

Parallèlement aux expériences sur les cellules conjonctivales, nous avons voulu aller plus loin dans l'étude des mécanismes inflammatoires déclenchés par l'hyperosmolarité sur la surface oculaire en nous intéressant à d'autres acteurs cellulaires. Nous avons préalablement démontré que les cellules conjonctivales, qui sont exposées en première ligne à l'hyperosmolarité, secrètent CCL2 dans ces conditions. Or, les principales cellules recrutées par CCL2 sont les monocytes, qui sont donc potentiellement attirés et présents sur la surface oculaire en hyperosmolarité lacrymale. Nous avons alors choisi d'étudier et de comparer les comportements des cellules conjonctivales et des cellules monocytaires en lignée continue en présence d'hyperosmolarité ainsi qu'en présence d'inducteurs de l'inflammasome, l'objectif de ces expériences étant de déterminer les interrelations entre ces deux types cellulaires dans des conditions de sécheresse oculaire. En outre, les monocytes représentent le type cellulaire le plus utilisé pour étudier l'activation de l'inflammasome car ils répondent bien aux activateurs de cette voie inflammatoire (602,603) ; ils présentent ainsi également l'avantage de servir de contrôle positif pour les expériences d'activation de l'inflammasome sur les cellules conjonctivales.

2.3.2. Expériences menées

La première étape de cette étude a été de vérifier si les cellules conjonctivales étaient capables d'induire la voie de l'inflammasome à la suite de la stimulation par des activateurs classiques de cette voie. En parallèle, ces conditions ont également été testées sur des cellules monocytaires, utilisées comme contrôle positif d'activation. Nous avons utilisé des inducteurs classiques de l'inflammasome : le LPS issu d'*Escherichia coli* ou le LTA issu de *Staphylococcus aureus* suivi par un traitement par ATP. Les cellules monocytaires contrôles exposées à ces stimuli ont secrété de l'IL-1 β en grande quantité, détectable en ELISA. En revanche, ces conditions appliquées aux cellules conjonctivales n'ont pas entraîné de sécrétion d'IL-1 β . Nous avons alors testé des doses plus élevées et/ou des temps d'application plus longs, sans obtenir d'effet sur la sécrétion d'IL-1 β mais en commençant à altérer la viabilité cellulaire.

Ces résultats nous ont conduit à envisager l'intervention de facteurs de costimulation pour éventuellement déclencher une réponse de la part des cellules épithéliales. Nous avons donc renforcé les conditions en combinant les facteurs d'activation classiques avec de faibles concentrations de BAK ou des conditions d'hyperosmolarité. Le protocole que nous avons utilisé nous permettait également d'étudier si ces deux stimuli seuls seraient capables d'activer l'inflammasome sur l'un des types cellulaires. Aucun de ces différents protocoles n'a conduit à la sécrétion d'IL-1 β par les cellules conjonctivales, tout comme l'hyperosmolarité et le BAK seul. Ces deux conditions seules n'ont également pas conduit à l'induction de la sécrétion d'IL-1 β par les cellules monocytaires. Cependant, la sécrétion d'IL-1 β induite par les activateurs classiques de l'inflammasome sur les cellules monocytaires a été complètement inhibée lorsque ces cellules étaient en milieu hyperosmolaire.

À la suite de ces résultats, nous avons décidé d'étudier en parallèle l'effet de l'hypo-osmolarité sur les deux types cellulaires. Ces expériences n'ont toujours pas conduit à la sécrétion d'IL-1 β par les cellules conjonctivales. Cependant, les conditions hypo-osmolaires ont induit une potentialisation de la sécrétion d'IL-1 β entraînée par les activateurs de l'inflammasome sur les cellules monocytaires.

En nous basant sur une étude menée sur des cellules conjonctivales montrant que ce type cellulaire n'exprimait pas à l'état basal le MD-2, une protéine accessoire essentielle pour la translocation du TLR4 du cytoplasme à la surface cellulaire (604), nous avons tenté de sensibiliser les cellules conjonctivales en les prétraitant avec l'IFN- γ , rapporté dans cette étude comme stimulant l'expression de MD-2 (605). Cependant, les cellules conjonctivales prétraitées n'ont pas révélé de sensibilité augmentée aux activateurs de l'inflammasome puisqu'aucune sécrétion d'IL-1 β n'a été détectée dans ces conditions (données non présentées dans la partie résultats).

Nous avons également voulu étudier les interrelations entre les différents types cellulaires. Pour cela, nous avons analysé l'effet de surnageants de cellules conjonctivales soumises à une hyperosmolarité, sur les cellules monocytaires, couplée ou non aux inducteurs de l'inflammasome, sans pour autant détecter d'effets différents de ceux observés en milieu classique (données non présentées dans la partie résultats).

Afin d'approfondir cette investigation, nous avons ensuite étudié l'expression génique d'IL-1 β et de NLRP3 sur les deux types cellulaires en présence ou non d'activateurs de l'inflammasome couplés ou non à des conditions hyper- ou hypo-osmolaires, ceci afin de déterminer si des modifications géniques étaient induites, notamment concernant les cellules conjonctivales. De plus, nous avons élargi cette étude à l'analyse de la chimiokine pro-inflammatoire CCL2, afin de comparer la réponse de ces deux types cellulaires concernant cette protéine en présence de PAMPS seuls (LPS ou LTA) couplés ou non à des conditions hyper- ou hypo-osmolaires.

2.3.3. Matériel et méthodes

Nous avons utilisé les cellules conjonctivales WKD et cultivé celles-ci dans les conditions classiques déjà évoquées dans les deux études précédentes. Nous avons également étudié les cellules monocytaires THP1 (American Type Culture Collection (TIB-202™, ATCC, Rockville, MD, USA)). Cette lignée cellulaire fréquemment utilisée provient d'une leucémie aiguë monocytaire. Les cellules THP1 ont été cultivées en milieu *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI) 1640 enrichi avec 10% de SVF, 1% de glutamine (200mM), 1% de pénicilline (10,000 units/mL) et 1% de streptomycine (10,000 μ g/mL) dans des conditions standard (atmosphère humide, 5% CO₂, 37°C).

Les cellules THP1 ont étéensemencées directement avec le premier stimulus (LPS ou LTA) pendant 4 heures combiné ou non à une condition d'osmolarité particulière : milieu classique (285 mOsM), milieu hyperosmolaire (500 mOsM) ou milieu hypo-osmolaire (200 mOsM). Ensuite, de l'ATP a été rajouté ou non dans le milieu pour 2 heures d'incubation supplémentaires avant récupération des surnageants, des lysats cellulaires ou de tester la viabilité. Ce protocole d'activation de l'inflammasome a été choisi en fonction des protocoles déjà rapportés dans d'autres études publiées (606,607).

Les cellules conjonctivales WKD ont subi au préalable une étape de privation en SVF pendant 24h avant toute stimulation, ceci afin de respecter les protocoles appliqués sur les cellules cornéennes déjà publiés (299). La suite du protocole a ensuite été réalisée sans SVF : le premier signal (LPS ou LTA) a été mis en contact avec les cellules pendant 4 heures combiné ou non à une condition d'osmolarité particulière : milieu classique (340 mOsM), milieu hyperosmolaire (500 mOsM) ou milieu hypo-osmolaire (200 mOsM). Ensuite, de l'ATP a été rajouté ou non dans le milieu pour 2 heures d'incubation supplémentaires avant récupération des lysats cellulaires ou pour 20 heures d'incubation supplémentaires avant récupération des surnageants ou de tester la viabilité. Ce temps d'incubation plus élevé avant la récupération des surnageants a été choisi afin de pouvoir détecter au mieux une éventuelle sécrétion, même tardive, d'IL-1 β .

Avec les lysats cellulaires obtenus, nous avons analysé les ARNm en RT-qPCR, après des étapes d'extraction des ARNs et de transcription inverse. Nous avons ainsi évalué l'expression génique d'IL-1 β , de NLRP3 et de CCL2. Pour déterminer la concentration d'IL-1 β et de CCL2 dans les surnageants, nous avons utilisé la technique ELISA (Duoset, R&D). Afin de pouvoir interpréter au mieux les résultats obtenus en ELISA, nous avons également effectué un test de viabilité (CellTiter-Blue®) dans chacune de ces conditions. Le matériel utilisé pour ces différents tests et techniques est le même que celui utilisé dans les deux études précédentes ; leurs références sont donc présentes dans les articles les citant. Tous les inducteurs utilisés proviennent de chez Sigma-Aldrich. Le milieu

hyperosmolaire a été obtenu par ajout de chlorure de sodium comme dans les études précédentes. Le milieu hypo-osmolaire a été obtenu par dilution du milieu en eau stérile. Les osmolarités ont toutes été vérifiées avec un osmomètre.

2.3.4. Résultats

Il est présenté dans cette partie uniquement les résultats des expériences concernant les inducteurs classiques couplés ou non à une hyper- ou à une hypo-osmolarité, étant donné l'absence d'effet observé dans les autres conditions testées.

Les inducteurs classiques de l'inflammasome induisent la sécrétion et l'expression génique d'IL-1 β par les cellules monocytaires (figure 1, A et B) ($p \leq 0,001$ pour LTA + ATP et $p \leq 0,0001$ pour LPS + ATP). Cette induction est diminuée lorsque les conditions hyperosmolaires sont combinées avec les inducteurs et la sécrétion de CCL2 est significativement inhibée dans le cas de la combinaison avec LPS + ATP, faisant passer la concentration de CCL2 dans le surnageant de 596 pg/mL à 4 pg/mL. L'effet inverse est observé en cas de combinaison des inducteurs avec des conditions hypo-osmolaires. En effet, l'hypo-osmolarité augmente significativement la sécrétion d'IL-1 β induite par les deux conditions d'inducteurs testées ($p \leq 0,05$ pour les deux conditions) ainsi que son expression génique ($p \leq 0,01$ pour les deux conditions).

Concernant le comportement des cellules conjonctivales, il n'est détecté aucune sécrétion d'IL-1 β avec les différentes conditions testées (figure 1, C). Les inducteurs de l'inflammasome en milieu classique n'induisent également pas de différence dans l'expression génique d'IL-1 β par ces cellules (figure 1, D). En revanche, toutes les conditions en hyperosmolarité induisent une diminution significative de l'expression génique d'IL-1 β , et ce même dans la condition sans inducteur. Les conditions couplant les inducteurs de l'inflammasome et l'hypo-osmolarité induisent, quant à elles, une augmentation de cette expression par rapport aux conditions équivalentes en milieu classique ($p \leq 0,01$).

L'expression génique du composant de l'inflammasome NLRP3 après 6h de stimulation est présentée dans la figure 2. Les seuls effets observés sur les cellules monocytaires sont une augmentation significative de cette expression dans les conditions couplant les activateurs de l'inflammasome et l'hypo-osmolarité comparée à ces conditions en milieu classique (figure 2, A). Les inducteurs seuls n'induisent pas, à ce temps d'exposition, une stimulation de l'expression génique de ce gène sur ces cellules.

Concernant les cellules conjonctivales, contrairement aux cellules monocytaires, ce sont toutes les conditions en milieu hyperosmolaire qui induisent une augmentation significative de l'expression génique de NLRP3 comparée aux mêmes conditions en milieu classique ($p \leq 0,0001$ pour toutes les conditions hyperosmolaires) (figure 2, B). Les inducteurs seuls ou l'hypo-osmolarité n'ont pas d'effets sur l'expression génique de NLRP3 dans les cellules conjonctivales.

L'effet pro-inflammatoire des PAMPs sur les deux lignées cellulaires étudiées est représenté dans la figure 3, *via* l'étude de la chimiokine CCL2. Le LPS et le LTA font sécréter CCL2 par les cellules monocytaires (figure 3, A). Cette sécrétion est totalement inhibée en hyperosmolarité passant de

206 à 5 pg/mL pour le LPS ($p \leq 0,0001$) et de 148 à 5 pg/mL pour le LTA ($p \leq 0,001$). La sécrétion induite par le LPS est de plus significativement augmentée en présence d'hypo-osmolarité. L'expression génique de CCL2 dans ces cellules est significativement stimulée par le LPS mais pas par le LTA et cette stimulation est significativement plus importante en un milieu hypo-osmolaire ($p \leq 0,001$) (figure 3, B).

Par contre, sur les cellules conjonctivales, ni le LPS ni le LTA n'ont induit de sécrétion de CCL2, mais ce sont toutes les conditions hyperosmolaires qui ont déclenché cette sécrétion ($p \leq 0,0001$) (figure 3, C). Le même profil d'induction par l'hyperosmolarité a été observé concernant l'expression génique de CCL2 sur ces cellules ($p \leq 0,0001$) (figure 3, D).

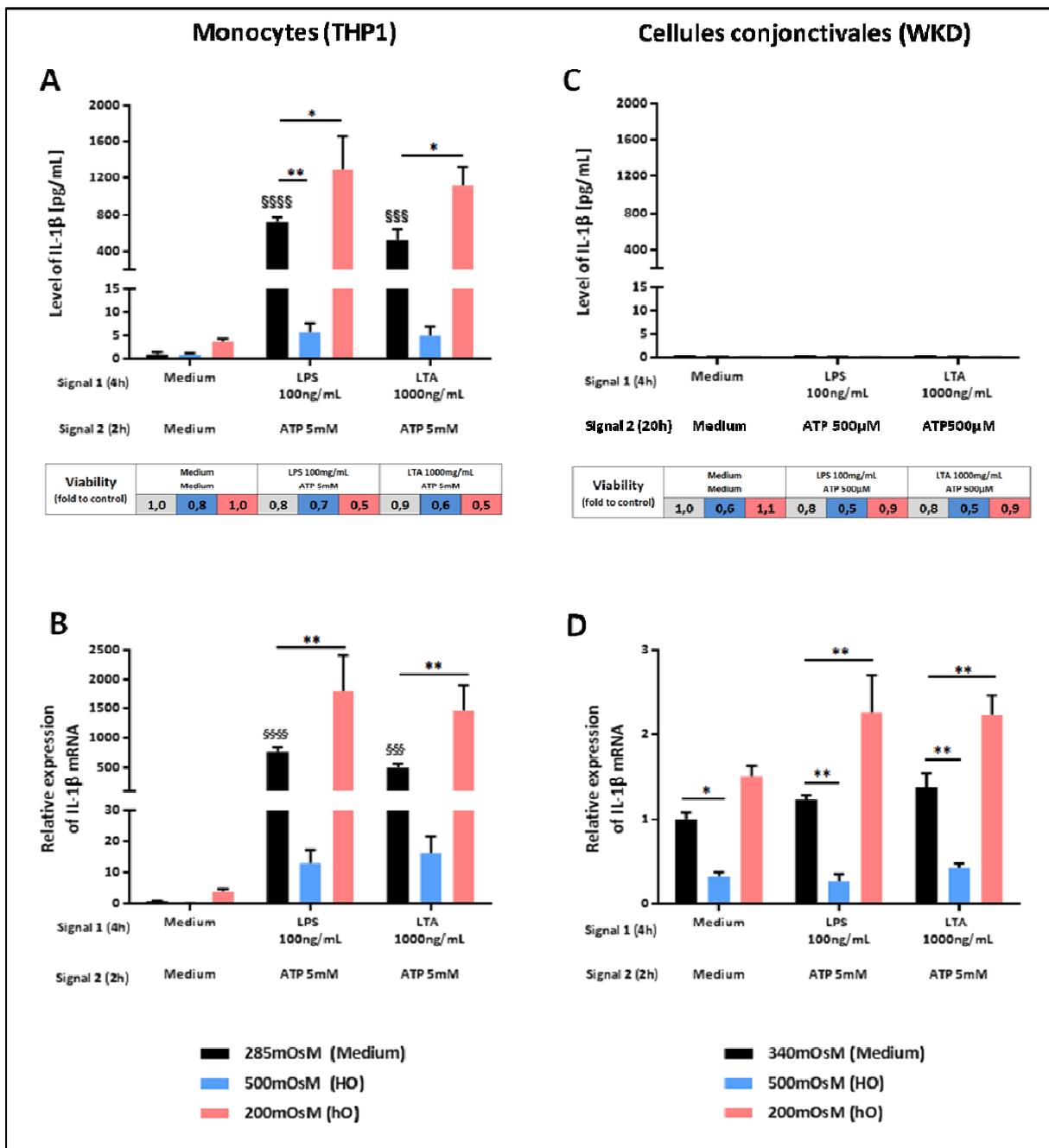


Figure 1. Étude de IL-1 β . Sécrétion évaluée en ELISA et expression génique évaluée en RT-qPCR sur les cellules monocytaires (A, B) et sur les cellules conjonctivales (C, D) après traitement avec des inducteurs de l'inflammasome dans des conditions d'hyperosmolarité ou d'hypo-osmolarité. Les données représentent les moyennes \pm SEM, n = 3 ou plus. Analyse statistique : two-way ANOVA suivi par un test de comparaison multiple de Tukey. 1) Analyse des effets des inducteurs seuls (LPS + ATP ou LTA + ATP) en milieu classique : § $p \leq 0.05$; §§ $p \leq 0.01$; §§§ $p \leq 0.001$; §§§§ $p \leq 0.0001$, comparé à la condition contrôle (sans inducteur et en milieu classique). 2) Analyse des effets de l'hyperosmolarité et de l'hypo-osmolarité sur ces conditions : * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$, comparé à la condition contrôle respective (en milieu classique). Il est de plus renseigné en dessous des graphiques des résultats d'ELISA A et C, les résultats du **test de viabilité** obtenus dans chacune de ces conditions (valeurs rapportées à la valeur du contrôle fixée à 1).**

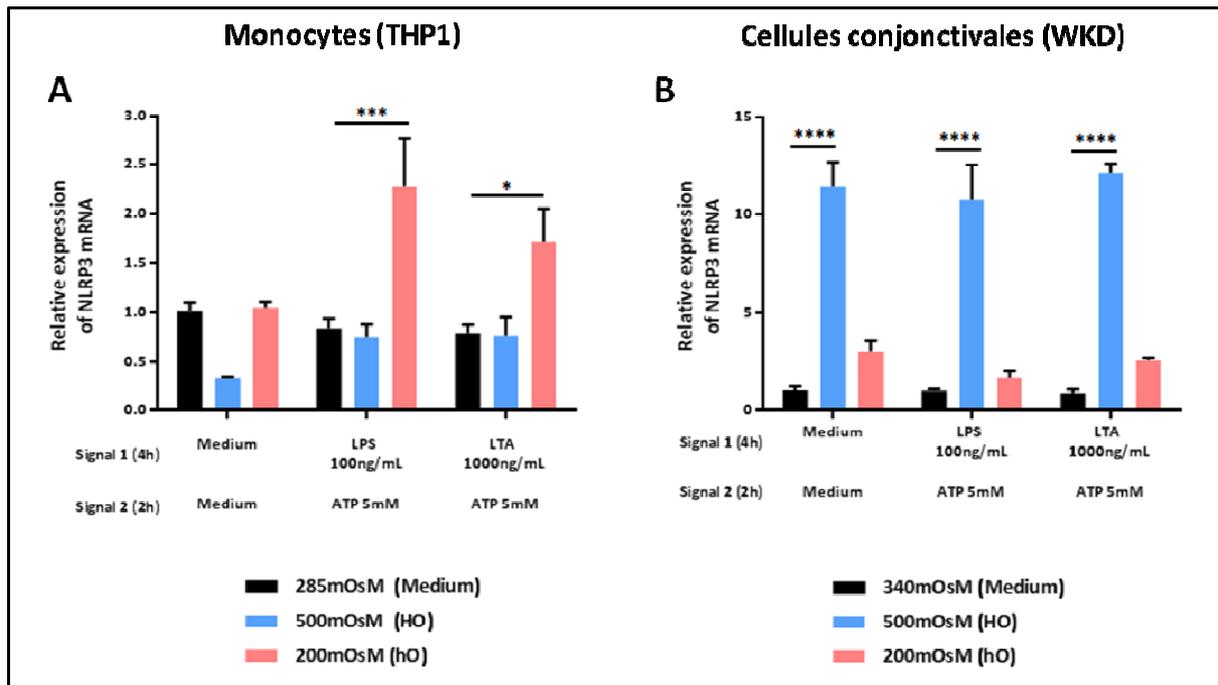


Figure 2. Étude de NLRP3. Expression génique évaluée en RT-qPCR sur les cellules monocytaires (A) et sur les cellules conjonctivales (B) après traitement avec des inducteurs de l'inflammasome dans des conditions d'hyperosmolarité ou d'hypo-osmolarité. Les données représentent les moyennes \pm SEM, $n = 3$ ou plus. Analyse statistique : two way ANOVA suivi par un test de comparaison multiple de Tukey. 1) Analyse des effets des inducteurs seuls (LPS + ATP ou LTA + ATP) en milieu classique : § $p \leq 0.05$; §§ $p \leq 0.01$; §§§ $p \leq 0.001$; §§§§ $p \leq 0.0001$, comparé à la condition contrôle (sans inducteur et en milieu classique). 2) Analyse des effets de l'hyperosmolarité et de l'hypo-osmolarité sur ces conditions : * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$, comparé à la condition contrôle respective (en milieu classique).

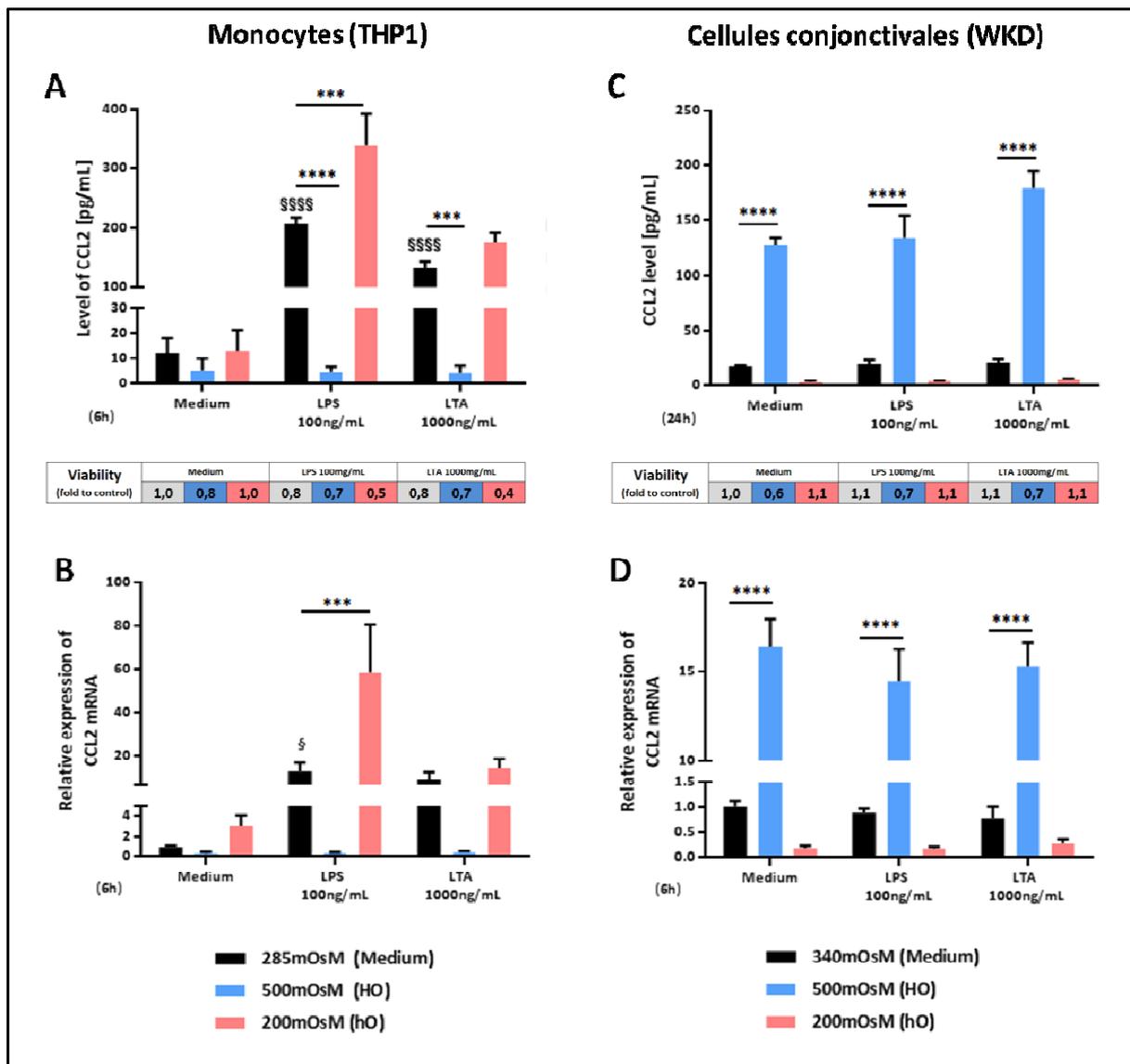


Figure 3. Étude de CCL2. Sécrétion évaluée en ELISA et expression génique évaluée en RT-qPCR sur les cellules monocytaires (A, B) et sur les cellules conjonctivales (C, D) après traitement avec du LPS ou du LTA dans des conditions d'hyperosmolarité ou d'hypo-osmolarité. Les données représentent les moyennes \pm SEM, $n = 3$ ou plus. Analyse statistique : two way ANOVA suivi par un test de comparaison multiple de Tukey. 1) Analyse des effets des inducteurs seuls (LPS + ATP ou LTA + ATP) en milieu classique : § $p \leq 0.05$; §§ $p \leq 0.01$; §§§ $p \leq 0.001$; §§§§ $p \leq 0.0001$, comparé à la condition contrôle (sans inducteur et en milieu classique). 2) Analyse des effets de l'hyperosmolarité et de l'hypo-osmolarité sur ces conditions : * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$, comparé à la condition contrôle respective (en milieu classique). Il est de plus renseigné en dessous des graphiques des résultats d'ELISA A et C, les résultats du **test de viabilité** obtenus dans chacune de ces conditions (valeurs rapportées à la valeur du contrôle fixée à 1).

2.3.5. Discussion

2.3.5.1. Étude de l'inflammation induite par les activateurs de l'inflammasome ou les PAMPs seuls en milieu classique

Les résultats obtenus dans ces expérimentations démontrent que les cellules épithéliales conjonctivales et les cellules monocytaires ont des comportements très différents en présence de PAMPs couplés ou non à de l'ATP.

Les cellules monocytaires, comme attendu, sont très réactives en réponse aux activateurs de l'inflammasome *via* l'induction importante d'IL-1 β . Elles sont également sensibles au LPS seul et répondent par l'induction de CCL2. De façon étonnante, le LTA n'a pas induit cette chimiokine. Or, le LPS et le LTA sont des stimuli inflammatoires classiques et donc fréquemment utilisés, notamment connus pour induire l'expression de CCL2 non seulement sur les monocytes et les macrophages (608,609) mais également sur de nombreux types cellulaires tels que les ostéoblastes (610), les kératinocytes (611) ou les cellules épithéliales alvéolaires (612) par exemple. Cette absence d'induction de CCL2 par le LTA est peut-être simplement due au protocole utilisé (dose ou temps non optimaux pour détecter une induction). Mais l'activation différente de chacun de ces activateurs, passant par le TLR4 pour le LPS et le TLR2 pour le LTA pourrait également intervenir et expliquer ces différences comme cela a pu être montré pour d'autres cytokines (613). Enfin, il a déjà été rapporté que le LTA serait moins puissant que le LPS pour induire la synthèse de cytokines (614).

Les cellules conjonctivales, elles, ne semblent pas répondre aux différents PAMPs testés, que ce soit en termes d'activation de l'inflammasome ou d'induction de CCL2. Pourtant, une étude a rapporté une induction de la sécrétion d'IL-1 (α/β) sous l'effet du LPS par les cellules conjonctivales (WKD), celle-ci étant toutefois extrêmement faible (39pg/mL) (87). Le protocole utilisé dans cette étude était cependant un peu différent (1 heure de stimulus par LPS 100ng/mL suivi de 23 heures de récupération avec un milieu de culture différent de celui que nous avons utilisé : le *Medium 199 Hank's balanced salt solution*, un milieu plus complexe, notamment plus riche en acides aminés et en vitamines). Cette discordance dans les résultats pourrait éventuellement être expliquée par ces différences de protocoles mais il faudrait confirmer cette hypothèse en reproduisant ce protocole exact avec la lignée cellulaire que nous avons utilisée. Notons que, concernant la détection d'IL-1 β , nous avons également étudié l'effet du LPS ou du LTA seuls, sans ATP, pendant 24h sur les cellules conjonctivales et que nous n'avons pas observé de sécrétion de cette cytokine (données non présentées).

Aucune étude à notre connaissance n'a analysé l'induction de CCL2 par le LTA ou le LPS sur des cellules conjonctivales. Par contre, il a été mis en évidence que ce type cellulaire (WKD) répondait par la sécrétion d'une autre cytokine pro-inflammatoire, IL-6, sous l'effet du LTA mais pas sous l'effet du LPS (605). La sécrétion d'IL-6 a pu être observée sous LPS après correction du déficit de ces cellules en MD-2, essentielle au signal TLR4, *via* un prétraitement avec IFN- γ . Nous avons alors effectué un prétraitement de nos cellules avec cette cytokine avant de tester nos différents stimuli mais nous n'avons toujours pas observé de sécrétion d'IL-1 β ou de CCL2 (données non présentées). Notons également qu'une étude portant sur une autre lignée de cellules conjonctivales (IOBA-NHC)

et sur des cellules cornéennes a montré que l'hyperosmolarité modulait l'expression des TLRs, augmentant notamment l'expression génique de TLR4 (453).

Ces résultats négatifs sur les cellules conjonctivales concernant l'induction des cytokines pro-inflammatoires recherchées semblent indiquer que les cellules WKD que nous avons utilisées dans ces expériences sont insensibles au LPS et au LTA. Cependant, pour confirmer cette hypothèse, il faudrait analyser d'autres marqueurs inflammatoires classiquement induits par le LPS et le LTA comme IL-6 et TNF- α . Il faudrait ensuite déterminer si cette insensibilité est liée à l'absence ou à un dysfonctionnement des récepteurs TLR4 et TLR2 à la membrane de ces cellules. L'utilisation d'autres ligands des TLRs, comme les peptidoglycanes bactériens, pourraient également permettre d'approfondir ces données. On ne peut également exclure une particularité due à ces cellules. Il faudrait ainsi également comparer ces résultats avec une lignée primaire ou une autre lignée de cellules conjonctivales.

L'expression génique du NLRP3 dans chacun des types cellulaires n'a pas été modifiée en présence des activateurs de l'inflammasome. Ce résultat négatif sur les cellules monocytaires laisse penser que le temps d'exposition choisi n'était peut-être pas optimal et ne nous permet pas de détecter une induction génique précoce. L'étude de l'expression génique de NLRP3 est peu étudiée dans la littérature, la détection protéique intracellulaire étant plus utilisée. Une étude sur des macrophages murins a cependant rapporté une légère augmentation de l'expression génique de NLRP3 après 6 heures de stimulation par LPS suivi de 30 minutes de stimulation par ATP (615), ce qui correspond environ au temps global que nous avons utilisé mais à une exposition à l'ATP plus courte. Une expérimentation sur différents temps d'exposition courts serait nécessaire pour déterminer si une induction génique de NLRP3 sur les cellules monocytaires est déclenchée par les activateurs de l'inflammasome.

Par ailleurs, une étude de la protéine NLRP3 serait également intéressante. Nous avons effectué quelques tests préliminaires de détection de celle-ci en Western Blot et nous n'avons pas observé de différence de son taux intracytoplasmique dans les cellules monocytaires en présence d'activateurs (données non présentées). D'autre part, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence la présence de cette protéine dans les cellules conjonctivales avec cette technique. Cela pourrait supposer que l'insensibilité de ces cellules aux activateurs de l'inflammasome serait due à l'absence de NLRP3. Néanmoins, ces expériences préliminaires de détection protéique doivent être refaites et renforcées avant de pouvoir aboutir à une conclusion certaine.

2.3.5.2. Étude de l'effet couplé de l'hyper- ou de l'hypo-osmolarité sur l'inflammation induite par les activateurs de l'inflammasome ou les PAMPs seuls

Les comportements des cellules monocytaires et conjonctivales vis-à-vis de conditions hyper- ou hypo-osmolaires sont également très différents. C'est suite aux résultats préliminaires obtenus en conditions d'hyperosmolarité avec les cellules monocytaires que nous avons décidé de rajouter les conditions hypo-osmolaires dans cette étude.

Effet de l'hypo-osmolarité rapportés dans la littérature

L'hypo-osmolarité extracellulaire provoque quasi instantanément un gonflement cellulaire par influx d'eau intracytoplasmique. Ce gonflement est suivi du phénomène régulateur RVD qui va induire la sortie d'ions Cl^- et K^+ *via* des canaux calciques et potassiques (616,617) ainsi que *via* les cotransporteurs KCC (618,619), l'efflux d'osmolytes organiques comme le glutamate, le myoinositol et la taurine (620,621) et l'efflux d'eau (167). L'ensemble de ces phénomènes va conduire à la réduction du volume cellulaire à son volume initial. Les conditions hypo-osmolaires peuvent apparaître physiologiquement dans l'organisme, comme c'est le cas au niveau des cellules intestinales après ingestion d'aliments ou de boissons, ou bien parfois au niveau des cellules gliales après une activité neuronale intense (622). Mais le gonflement cellulaire induit par hypo-osmolarité peut également intervenir dans certaines conditions non physiologiques comme lors d'hyponatrémie, une situation pouvant apparaître en cas d'altération des fonctions hormonales ou rénales. Les effets de l'hypo-osmolarité ont été analysés sur de nombreux types cellulaires différents tels que les hépatocytes, les cellules gliales (621,623), les cellules intestinales, les cellules rénales, les monocytes ou d'autres cellules sanguines (624).

Ces études *in vitro* ont démontré que l'hypo-osmolarité stimule différents acteurs intracellulaires parmi lesquels les MAPKs. ERK est la MAPK qui est majoritairement identifiée comme activée par ces conditions dans plusieurs types cellulaires (625–628). Concernant l'activation de p38 et JNK, les résultats diffèrent suivant les types cellulaires étudiés, notons qu'elles sont par exemple stimulées par l'hypo-osmolarité dans les hépatocytes (629). L'activation de NF κ B sur ce type cellulaire par l'hypo-osmolarité est également rapportée (629). Ainsi, bien qu'étant des phénomènes inverses, l'hyper- et l'hypo-osmolarité semblent stimuler en partie les mêmes voies intracellulaires, sans pour autant conduire aux mêmes réponses cellulaires finales.

Par ailleurs, il a été observé que le stress hypo-osmolaire induisait lui aussi une augmentation de production des EROs (630,631). Concernant les effets pro-inflammatoires, une étude en conditions hypo-osmolaires (150 mOsM) sur des cellules épithéliales intestinales a révélé l'induction de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-8 et IL-6, la sécrétion d'IL-8 ayant été liée à l'activation de la voie JNK (632).

Concernant la surface oculaire, quelques études ont été menées pour caractériser le RVD induit par l'hypo-osmolarité sur des cellules cornéennes humaines ou de lapin. Elles ont rapporté l'importance des canaux K^+ (633), du cotransporteur KCC (181,634), du canal TRPV4 (635) et des mouvements intracytoplasmiques de Ca^{2+} (636) dans ce phénomène. Une autre étude sur des cellules cornéennes de lapin en hypo-osmolarité a également montré que le gonflement cellulaire induit l'activation de ERK et JNK, alors que l'activation de p38 est, quant à elle, une conséquence du RVD qui suit la phase de gonflement (637). Aucune étude à notre connaissance n'a été menée sur les cellules de la surface oculaire concernant l'effet de l'hypo-osmolarité en termes de marqueurs pro-inflammatoires.

Résultats obtenus sous l'effet d'une hypo-osmolarité

Nous avons observé un effet potentialisateur de l'hypo-osmolarité sur l'inflammation induite par différents stimuli dans les cellules monocytaires (voie de l'inflammasome activée (IL-1 β et NLRP3) et induction de CCL2, que ce soit en expression génique ou en sécrétion). Les effets stimulants sur l'activation de l'inflammasome confirment des observations similaires rapportées sur des monocytes

(638–640). Une de ces études propose un mécanisme pour expliquer cette stimulation : le gonflement cellulaire induit par l'hypo-osmolarité conduit à une diminution de la concentration intracellulaire en ions K^+ par simple dilution, une concentration qui va alors passer sous le seuil d'activation de l'inflammasome et ainsi aider au déclenchement de celui-ci. La diminution de la concentration cellulaire en K^+ est en effet un signal d'activation de l'inflammasome déjà bien identifié.

Les cellules conjonctivales sous hypo-osmolarité ont elles aussi présenté une augmentation de l'expression génique d'IL-1 β , ce qui va dans le sens des observations faites sur les cellules monocytaires.

Résultats obtenus sous l'effet d'une hyperosmolarité

Sur les cellules monocytaires, nous avons observé que l'hyperosmolarité inhibait très fortement l'induction de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et CCL2 induite par les stimuli testés. Cet effet inhibiteur de l'inflammasome a été rapporté dans deux des études sur les monocytes citées plus haut (639,640). De plus, de nombreuses études ont été menées sur des cellules sanguines car le traitement par solution saline hyperosmolaire est souvent utilisé pour traiter les patients en choc traumatique, en œdème cérébral et ayant une élévation de la pression intracrânienne. Les études *in vitro* sur des cellules sanguines (polynucléaires, cellules mononucléaires, leucocytes) ont démontré un pouvoir modérateur de l'hyperosmolarité sur l'inflammation, soit sur l'induction d'IL-8, TNF- α , IL-1 β , IL-6, et MIF par le LPS ou le peptidoglycane (641–646). Des études *in vivo* ont également conforté cette observation (647). D'autres études *in vitro* ont aussi montré les effets anti-inflammatoires des conditions hyperosmolaires sur l'inflammation induite par d'autres stimuli tels que des cytokines pro-inflammatoires sur des cellules épithéliales pulmonaires (648) ou des conditions d'hypoxie sur des cellules microgliales (649). Une étude citée plus haut analysant les effets de l'hyperosmolarité sur l'expression des TLRs dans les cellules cornéennes a également rapporté cet effet inhibiteur de l'hyperosmolarité sur la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 induite par le LPS seul ou le LPS et l'IFN- γ combinés (453).

Une étude est tout de même en contradiction avec ces nombreuses observations (230). Cette étude menée sur des cellules mononucléées sanguines a rapporté que l'hyperosmolarité seule induisait une stimulation génique d'IL-1 α , IL-1 β et IL-8 qui cependant ne conduisait pas à une augmentation de la sécrétion de ces protéines. Elle rapporte de plus que, lorsque des conditions d'hyperosmolarité étaient rajoutées à un stimulus par LPS, les sécrétions d'IL-1 α , IL-1 β , IL-8 et TNF- α induites étaient potentialisées par rapport à celles entraînées par le LPS seul. L'hypo-osmolarité dans cette étude a, quant à elle, conduit à une diminution de la sécrétion basale d'IL-8.

Les cellules conjonctivales, en revanche, ont présenté un comportement inverse en présence d'hyperosmolarité concernant CCL2 avec l'induction de celle-ci, comme déjà observé dans les études précédentes, et ceci de façon indépendante des stimuli LPS et LTA. Concernant les acteurs de l'inflammasome, les résultats obtenus sur ces cellules sont contradictoires puisque l'hyperosmolarité inhibe l'expression génique d'IL-1 β , comme dans les cellules monocytaires, mais stimule fortement l'expression génique de NLRP3. Ce dernier résultat est difficile à expliquer car il dénote avec l'ensemble des autres résultats obtenus avec les deux types cellulaires qui vont dans le sens d'un effet inhibiteur de l'hyperosmolarité sur l'inflammasome. Ces résultats nécessiteraient ainsi des

études complémentaires plus approfondies telles que celles décrites un peu plus haut concernant le NLRP3 (temps d'expositions différents et détection de la protéine intracytoplasmique). Notons également que l'hyperosmolarité seule n'a ainsi pas non plus induit de sécrétion d'IL-1 β par ces cellules alors que ce modèle appliqué sur des cellules cornéennes a montré à plusieurs reprises l'induction de cette interleukine.

2.3.6. Conclusion

Ces résultats nous ont permis de mieux cerner les effets de différents acteurs potentiellement présents sur la surface oculaire de patients atteints de sécheresse oculaire, sur les cellules conjonctivales comparées à des cellules monocytaires. Certains de ces effets étaient non attendus et ont soulevé de nouvelles questions. Il serait donc nécessaire de les approfondir, notamment en complétant par l'étude d'autres inflammasomes comme le NLRP1 ou d'autres composants des inflammasomes tels qu'ASC et la caspase-1 ainsi que par l'analyse de la sécrétion de l'autre produit final de l'inflammasome, IL-18. Pour l'instant, ces résultats préliminaires tendent à montrer que les cellules monocytaires recrutées dans les conditions hyperosmolaires par les cellules conjonctivales inhiberaient plutôt leurs réponses pro-inflammatoires dans ces conditions, ce qui est une observation étonnante. En effet, nous pensions observer que les acteurs recrutés à la surface oculaire lors d'une sécheresse oculaire participeraient au maintien de l'inflammation et ainsi à l'entretien du cercle vicieux présent dans la sécheresse oculaire. Ces résultats sont donc à compléter. Il serait notamment intéressant d'étudier le comportement de monocytes différenciés en macrophages, car c'est la forme retrouvée dans les tissus après recrutement dans la circulation générale; ce modèle serait ainsi plus représentatif de la situation physiologique réelle. Ces macrophages peuvent présenter un comportement inflammatoire en présence d'hyperosmolarité différent de celui des monocytes circulants et apporter alors des précisions sur les interrelations entre les différents acteurs cellulaires dans les conditions hyperosmolaires.

D'autre part, l'hypo-osmolarité, une condition non prévue au commencement de l'étude, s'avère induire des effets importants sur les cellules monocytaires surtout, mais également sur les cellules conjonctivales. Une caractérisation plus complète des effets de cette condition sur les cellules de la surface oculaire serait utile car pourrait avoir un intérêt en termes d'optimisation de formulation des médicaments. En effet, actuellement, les produits destinés à traiter la sécheresse oculaire sont formulés de façon à être hypo-osmolaires. L'apparition du concept du traitement de la sécheresse oculaire à l'aide de solutions hypo-osmolaires afin de contrecarrer les effets de l'hyperosmolarité lacrymale a émergé dans les années 1980. Il a été appuyé à de nombreuses reprises par des études cliniques démontrant les effets bénéfiques de formulations hypo-osmolaires (150 mOsM) de solutions salines (650) ou de hyaluronate de sodium (651–653) tant sur les symptômes de la sécheresse oculaire que sur les paramètres de la surface oculaire et du film lacrymal. Une étude *in vivo*, avec un modèle de sécheresse oculaire murin induit par un stress dessiccateur couplé à l'injection de scopolamine, a également rapporté les effets anti-inflammatoires plus importants de ce type de formulation. En effet, une solution de hyaluronate de sodium 0,18% hypo-osmolaire (150 mOsM) a entraîné une diminution des marqueurs pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β et CD40 dans la conjonctive plus importante qu'une solution de hyaluronate de sodium 0,1% iso-osmolaire (654) (notons tout de même que cette dernière était moins concentrée en acide hyaluronique). Lors d'instillation de collyres hypotoniques, les cellules de la surface oculaire sont

donc transitoirement exposées à une condition hypo-osmolaire, laquelle au vu de ces résultats préliminaires ne s'avère pas si anodine et peut-être pas d'une totale innocuité. Sans remettre pour autant en cause le concept de l'hypo-osmolarité pour traiter la sécheresse oculaire, un concept qui a largement fait ses preuves, les résultats préliminaires que nous avons obtenus ont le simple mérite d'attirer l'attention sur la vigilance à maintenir concernant les effets de l'hypo-osmolarité sur la surface oculaire, d'autant plus sur une surface oculaire altérée comme c'est le cas chez les patients atteints de sécheresse oculaire.

DISCUSSION-CONCLUSION

La sécheresse oculaire est une pathologie oculaire fréquente dans la population âgée de plus de 50 ans. Cependant, malgré une forte prévalence, cette maladie est souvent sous-estimée ou mal considérée en raison de son apparente bénignité (2). Or, cette pathologie a un impact non négligeable sur la qualité de vie des patients, et même sur leur psychisme dans les cas les plus sévères. Malheureusement, l'arsenal thérapeutique proposé actuellement est pauvre et consiste essentiellement en des substituts lacrymaux. Ce manque de molécules thérapeutiques pour la sécheresse oculaire peut être expliqué par le caractère apparemment bénin de cette pathologie mais également par le fait que le mécanisme précis de la maladie reste encore peu connu et qu'ainsi peu de cibles thérapeutiques sont identifiées. C'est en effet une pathologie complexe qui fait intervenir toutes les structures de l'unité fonctionnelle lacrymale, notamment la surface oculaire, les glandes lacrymales et les paupières, qui vont être le lieu de phénomènes inflammatoires et dysimmunitaires chroniques. Malgré tout, de nombreuses études sont menées sur cette pathologie et apportent ainsi, au fur et à mesure, des observations précieuses permettant petit à petit d'élucider les différents processus et cascades d'événements impliqués dans l'apparition et le maintien de l'inflammation chronique, un phénomène caractéristique de la pathologie.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse nous permettent d'apporter une contribution décisive à l'identification des mécanismes sous-jacents impliqués dans la sécheresse oculaire. Ils permettent en effet de mieux comprendre le comportement d'un acteur important de cette pathologie, l'épithélium conjonctival, dans des conditions similaires à celles présentes dans la sécheresse oculaire. Ces résultats participent ainsi à la progression des connaissances des mécanismes de la pathologie, notamment en confirmant la composante inflammatoire ainsi que l'implication de la conjonctive dans ce processus.

Nous allons d'abord cerner les difficultés auxquelles il faut faire face lors d'études de la sécheresse oculaire mais également les avantages de certains de ses modèles. Puis, nous expliquerons le rationnel nous ayant mené au choix du modèle d'hyperosmolarité et de ses modalités pour ces différentes expériences, en présentant ses atouts et ses inconvénients. Enfin, nous discuterons ensuite les différents résultats obtenus dans ces travaux et nous préciserons les expériences complémentaires à effectuer afin de confirmer ou approfondir les observations faites.

Les problématiques d'étude de la sécheresse oculaire

La difficulté de l'étude de la sécheresse oculaire réside dans le fait qu'il s'agit d'une maladie multifactorielle ayant de nombreuses étiologies et impliquant des mécanismes sous-jacents divers.

Concernant les études cliniques, cette pathologie, en touchant cet organe sensoriel directement en contact avec l'extérieur qu'est l'œil, présente néanmoins l'avantage de pouvoir être explorée du fait de l'accès facilité à deux types de prélèvements porteurs de nombreux renseignements : le liquide lacrymal et la couche cellulaire externe de l'épithélium conjonctival *via* la technique de l'empreinte conjonctivale. Les études cliniques sont cependant souvent confrontées à la difficulté de diagnostic liée à une dissociation fréquente entre les signes cliniques et les symptômes ainsi que l'absence de biomarqueurs spécifiques identifiés de la maladie. Cela conduit

parfois à des différences importantes dans les critères d'inclusion dans les essais d'une étude à une autre. Les étiologies très diverses conduisent également dans certains cas à une population de patients hétérogène, lorsque les étiologies ne sont pas précisées ni différenciées. Ces variabilités de populations peuvent ainsi induire des biais dans les essais et conduire à masquer des observations potentiellement intéressantes mais caractéristiques seulement d'une sous-population particulière des patients atteints. C'est pourquoi d'ailleurs, un des champs de recherche les plus actifs sur cette pathologie est de tenter d'identifier un biomarqueur de celle-ci qui permette également de grader la sévérité de la pathologie. Ces études sont souvent menées sur l'analyse de la composition des larmes, notamment en termes de cytokines pro-inflammatoires par exemple (655), mais à ce jour aucun biomarqueur robuste n'a été identifié. HLA-DR reste actuellement le meilleur marqueur de l'inflammation de la surface oculaire de la pathologie.

Concernant les modèles *in vivo*, il est rapporté dans la littérature un très grand nombre de modèles expérimentaux différents, aucun n'étant le reflet parfait et précis de la complexité et de la chronicité de cette pathologie (327). Néanmoins, la majorité de ces modèles est efficace en ce qui concerne l'induction des signes cliniques principaux de la pathologie, à savoir une altération des épithéliums de la surface oculaire et une diminution de la sécrétion lacrymale, souvent accompagnées par une perte des cellules à mucus et des phénomènes inflammatoires à la surface comme c'est cas pour le modèle le plus fréquemment utilisé couplant l'application d'un stress dessiccateur physique à l'administration de scopolamine (235,391). Ces modèles, suivant le protocole choisi pour induire la sécheresse oculaire, permettent également de différencier les sécheresses par hyposécrétion lacrymale de celles par instabilité du film lacrymal et évaporation excessive. De plus, certains types de souris, tels que les souris NOD ou les souris Aire-KO, permettent d'étudier plus spécifiquement la sécheresse oculaire liée à des mécanismes d'auto-immunité, reflétant davantage le cas particulier du SGS (371,374,375).

Les modèles *in vitro* de sécheresse oculaire, eux, sont bien moins nombreux que les modèles *in vivo* et consistent pour la grande majorité en la culture de cellules de la surface oculaire en milieu hyperosmolaire ; très peu utilisent un stress réellement dessiccateur par contact direct avec l'air ambiant, avec ou sans flux (361,454). Ces modèles présentent les avantages et les inconvénients classiques de tout modèle *in vitro* : une facilité de réalisation et un faible coût mais contrebalancés par une simplification extrême de la pathologie et ainsi un manque de représentativité physiologique. Ainsi, le modèle *in vitro* utilisé dans notre travail sur des cellules conjonctivales représente un modèle simple, constitué d'une monocouche d'un seul type cellulaire, qui ne rend pas compte de l'interaction de ces cellules avec les autres types cellulaires présents dans la surface oculaire tels que les cellules à mucus, les cellules cornéennes ou les cellules immunitaires, qui interagissent pourtant fortement ensemble, en particulier pendant le processus d'inflammation. Cependant, nous avons tout de même choisi ce modèle car il permet de réaliser des études de mécanistique à l'échelle de la cellule relativement aisément, notre but étant de caractériser le comportement spécifique des cellules conjonctivales. Les résultats obtenus avec ce modèle d'hyperosmolarité permettent alors d'obtenir des données préliminaires sur la pathologie et d'identifier certains mécanismes impliqués afin d'orienter les recherches sur des modèles *in vivo*, plus représentatifs de la pathologie, qui permettront de confirmer les différentes observations obtenues et les hypothèses soulevées avec ce modèle cellulaire.

Rationnel ayant conduit au choix du protocole d'hyperosmolarité

L'hyperosmolarité lacrymale est actuellement considérée comme un des meilleurs indicateurs de sécheresse oculaire (656). Le modèle d'hyperosmolarité permet ainsi de mimer les conditions dans lesquelles baignent les cellules de la surface oculaire au cours de cette pathologie.

Dans les études utilisant ce modèle, les cellules de la surface oculaire, dans la très grande majorité des cellules cornéennes, sont souvent exposées à un protocole mettant en jeu des doses d'hyperosmolarité très élevées allant jusqu'à 700 mOsM. Le protocole le plus classique consiste en l'application d'une hyperosmolarité de 500 mOsM durant des périodes allant jusqu'à 24 heures. Or, le film lacrymal d'un patient atteint de sécheresse oculaire présente généralement une osmolarité comprise entre 316 et 360 mOsM, l'osmolarité lacrymale normale étant comprise entre 296 et 302 mOsM (33,115,656–658). Notons tout de même qu'il existe des recouvrements entre les valeurs d'osmolarité lacrymale des individus sains et celles des patients atteints de sécheresse oculaire, que ce soit dans un sens ou dans l'autre. Dans certains cas de sécheresse oculaire, ces valeurs d'osmolarité peuvent parfois atteindre des niveaux plus élevés, des études ayant détectés des hyperosmolarités allant jusqu'à 424 mOsM (659) ou 440 mOsM (111). De plus, une étude a rapporté qu'une application topique de solution hyperosmolaire de 800 à 900 mOsM (660) provoquait une sensation de brûlure au niveau de l'œil similaire à celle rapportée lors de l'apparition d'une rupture du film lacrymal. Ces résultats laissent penser que des pics d'hyperosmolarité très élevés transitoires, et donc difficiles à détecter, peuvent se produire dans la sécheresse oculaire. Ces pics d'osmolarité seraient même responsables de certains des symptômes de la pathologie.

Malgré ces observations rapportant des osmolarité élevées, le protocole consistant à exposer les cellules de la surface à 500 mOsM pendant plusieurs heures paraît drastique au vu des données cliniques. Cette osmolarité élevée est cependant nécessaire pour observer des réponses de la part des cellules en un temps réduit, réponses comparables à celles observées lors des études cliniques (phénomènes d'apoptose, apparition d'un stress oxydant et réponses pro-inflammatoires) (222,299). Les études *in vitro* sur cellules adhérentes, ayant de plus un taux de division rapide comme c'est le cas des cellules conjonctivales WKD que nous avons utilisées, ne peuvent en effet durer plus de quelques jours, les cellules devenant rapidement hyperconfluentes. Afin de pouvoir étudier les effets d'une condition dont les effets biologiques et éventuellement toxiques ne se développent que lorsque celle-ci est appliquée durant une période très longue, les toxicologues se réfèrent souvent à une extrapolation de la "loi de Haber" qui, au départ, s'applique aux toxiques par inhalation. Cette loi explique que l'effet biologique d'un toxique (E) est dépendant de sa concentration (C) et de sa durée de l'exposition (t), selon l'équation $E=C.t$. Ce principe souvent invoqué en toxicologie justifie alors l'utilisation de concentrations élevées d'un stimulus sur des temps courts dans le but de prévoir ses effets à une concentration plus faible sur une durée plus longue.

Ce modèle *in vitro* de sécheresse oculaire peut également être réalisé avec différents osmolytes pour augmenter l'osmolarité du milieu, le NaCl étant le plus utilisé. Il existe en effet des études sur des cellules cornéennes pour lesquelles l'hyperosmolarité a été induite par l'ajout de sucrose (171,176,250), de mannitol (600) ou de glycérol (450). Certaines de ces études ont utilisé parfois plusieurs de ces osmolytes afin de les comparer et n'ont pas détecté de différences concernant l'activation des MAPKs (444,450) ou la sécrétion d'IL-1 β (sécrétion nulle par ailleurs)

(600). Nous avons choisi d'utiliser l'hyperosmolarité saline car, en plus d'être la plus utilisée, elle apporte des ions Na^+ et Cl^- qui sont présents en quantité relativement importante dans le film lacrymal à l'état physiologique (cf. Tableau 1 dans la première partie de ce manuscrit). En outre, il a été rapporté chez les patients atteints de sécheresse oculaire une augmentation du taux lacrymal de sodium, passant de 133,2 à 145,1 mmol.L^{-1} dans les sécheresses oculaires mixtes, une élévation qui concerne également les autres ions présents dans le liquide lacrymal (661). Par ailleurs, dans un modèle *in vivo* par stress dessiccatif associé à l'administration de scopolamine, il a été observé, couplé à l'augmentation de l'osmolarité du film lacrymal, une augmentation de la concentration sodique de celui-ci, avec un doublement des valeurs après 2 jours d'application du modèle (435). Néanmoins, il serait intéressant de confirmer nos résultats en utilisant d'autres inducteurs d'hyperosmolarité que le NaCl.

Un des atouts de notre étude est d'avoir utilisé des cellules conjonctivales, un type cellulaire relativement peu étudié dans ce modèle. En effet, les études sur les effets de l'hyperosmolarité *in vitro* sur des cellules conjonctivales sont moins d'une dizaine. L'une de celles-ci menée sur la lignée cellulaire WKD a montré que l'hyperosmolarité induisait une diminution de la viabilité cellulaire et l'apparition de phénomènes d'apoptose (222). D'autres études ont utilisé la lignée conjonctivale IOBA-NHC et ont fait état d'une diminution de la résistance de la monocouche formée par ces cellules (662) ainsi qu'une modulation des TLRs comme le TLR4 (453) en présence d'un stress hyperosmolaire. Une étude très récente sur ces cellules a également identifié certaines voies cellulaires activées par l'hyperosmolarité telle que la voie inflammatoire de la synthèse des prostaglandines (663). Enfin, des études sur des cellules primaires ont démontré en présence d'hyperosmolarité une augmentation de l'expression de HLA-DR (452) et de la production d'IL-6, une stimulation de la voie JNK et de la caspase 3 ainsi que l'expression de *nerve growth factor* (NGF) qui aurait un rôle dans l'apoptose observée dans ces conditions (86). Notons que nous avons également étudié l'expression de HLA-DR dans les cellules conjonctivales WKD mais nous n'avons pas observé d'augmentation significative de celle-ci sous hyperosmolarité (données non présentées). Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par la différence de nature des cellules conjonctivales testées (lignées/primaires).

Intérêts, critiques et perspectives des résultats obtenus dans ces travaux

Les résultats obtenus lors des expérimentations analysant les effets du BAK et de l'hyperosmolarité ont confirmé la potentialisation de leurs effets concernant la libération de certains marqueurs pro-inflammatoires, plus précisément MIF et IL-8. Cette libération serait probablement due à la mort des cellules intervenant dans ces conditions, conduisant à la libération de stocks préformés de ces médiateurs, leur expression génique n'étant pas induite. Il a été observé une induction de l'expression génique et de la sécrétion de CCL2 sous hyperosmolarité seule. L'adjonction de BAK à cette condition conduit à une induction de CCL2 moins importante, ce qui laisse penser que ces cellules privilégient d'autres processus que celui de l'induction de CCL2 dans ces conditions de forte toxicité et ce qui favorise l'hypothèse d'une absence de stock préformé pour CCL2. Nous avons également observé une augmentation de la translocation nucléaire du facteur de transcription protecteur de l'hyperosmolarité, NFAT5, dans ce modèle de double stress. Les résultats que nous avons obtenus complètent une précédente étude publiée démontrant que l'ajout de conditions hyperosmolaires au BAK potentialisait le stress oxydant engendré et la mort cellulaire par apoptose

(222). Ces résultats *in vitro*, méritent maintenant d'être confirmés par des études *in vivo* en utilisant le modèle de sécheresse oculaire hyperosmolaire.

Ces nouvelles données concernant l'inflammation permettent de confirmer la toxicité du BAK et la nécessité d'éliminer ce conservateur des formulations ophtalmiques, d'autant plus si celles-ci sont destinées à être administrées sur une surface oculaire en sécheresse. Les observations démontrant les effets délétères de cette molécule utilisée au long terme s'accumulant depuis une vingtaine d'année, la tendance actuelle est de chercher à s'en affranchir en développant des collyres unidoses ou des collyres multidoses présentant un système de délivrance spécial évitant les risques de contamination. Deux dispositifs de ce type sont disponibles en France depuis les années 90. Le dispositif ABAK[®], conçu pour limiter le risque de contamination par aspiration, consiste en une membrane antibactérienne présente entre l'embout et le contenu du flacon qui piège les résidus éventuellement aspirés. Il est parfois associé à un conservateur mais alors une seconde membrane filtrante adsorbante filtre le collyre au moment de son instillation pour l'épurer du conservateur. L'autre dispositif est le système COMOD[®] qui permet l'instillation du collyre sans retour d'air, car le sachet contenant le collyre (situé à l'intérieur du flacon) se rétracte au fil des utilisations. En outre, les valves et ressort en contact avec le collyre sont recouverts d'un film d'argent minéral aux propriétés antibactériennes (664). Pour certains principes actifs, notamment les antiglaucomateux, des formes à libération prolongée sont également développées afin de diminuer le nombre d'administrations journalières et la fréquence des contacts avec le conservateur améliorant ainsi l'observance et la qualité de vie du patient.

Ces premiers résultats nous ont permis de focaliser la suite de nos travaux sur la chimiokine CCL2 qui est une chimiokine pro-inflammatoire jouant un rôle majeur dans l'inflammation par sa capacité d'attraction des monocytes circulants et des macrophages tissulaires. Bien que cette chimiokine ait été détectée lors de quelques études, elle a néanmoins fait l'objet de peu de travaux comparativement à d'autres facteurs pro-inflammatoires tels que TNF- α , IL-1 β , IL-8 ou IL-6. Dans notre étude, nous avons pris le temps de bien caractériser cette induction afin d'optimiser le protocole d'étude et de finalement opter pour le protocole classique de 500 mOsM qui n'induisait sur ces cellules qu'une faible mortalité cellulaire, inférieure à 20%, tout en stimulant une réponse pro-inflammatoire importante.

Nous avons pu identifier sur les cellules conjonctivales les voies intracellulaires mises en œuvre pour aboutir à la sécrétion de CCL2, que ce soit les MAPKs ou le NF κ B, des voies classiques intracellulaires impliquées dans des phénomènes aussi divers que nombreux tels que la croissance cellulaire, la différenciation, la survie ou la mort cellulaire. L'acteur le plus intéressant identifié dans notre étude est le NFAT5, ce qui confirme le rôle majeur de ce facteur de transcription dans la réponse inflammatoire induite par l'hyperosmolarité sur la surface oculaire. Nous apportons ainsi une confirmation aux résultats d'autres études publiées ayant lié l'effet pro-inflammatoire de l'hyperosmolarité à ce facteur de transcription (221,249,598). De plus, les résultats obtenus avec les molécules thérapeutiques testées permettent d'identifier certains de leurs mécanismes anti-inflammatoires mis en jeu dans la sécheresse oculaire. Ces résultats permettent de penser que l'effet bénéfique de la CsA et de la Dex dans la sécheresse oculaire pourrait être en partie lié à l'inhibition de la sécrétion de CCL2 induite par la pathologie, une inhibition qui, dans le cas de la Dex, pourrait être liée à son effet inhibiteur de l'expression de NFAT5 induite par l'hyperosmolarité.

Pour compléter l'ensemble de ces résultats, il serait intéressant d'effectuer des expériences complémentaires pour déterminer les liens entre tous ces acteurs, notamment déterminer si les

agents thérapeutiques testés induisent l'activation des MAPKs ou de NFκB (par Western Blot) ou la translocation de NFAT5 (par immunomarquage). Ces différentes expériences permettraient ainsi de définir l'ordre d'intervention des différents acteurs que nous avons identifiés lors du stress hyperosmolaire ainsi que de mieux caractériser les effets anti-inflammatoires des molécules thérapeutiques testées. Une fois encore, les résultats obtenus devront ensuite être confirmés avec des études mettant en œuvre des modèles *in vivo* de sécheresse oculaire.

L'identification de ces différentes voies intracellulaires potentiellement impliquées dans la sécheresse oculaire permet non seulement de comprendre un peu mieux les mécanismes de la pathologie mais également de découvrir de potentielles cibles thérapeutiques en bloquant la voie CCL2, NFAT5 ou certaines voies des MAPKs, dont p38. Concernant cette dernière, une étude analysant les effets d'une injection dans les glandes lacrymale de l'inhibiteur de p38 que nous avons utilisé dans nos expériences, SB203580, a rapporté une amélioration de la stabilité lacrymale et de la surface oculaire chez la souris MRL/lpr, un modèle *in vivo* de SGS (436). Approfondir ces résultats en identifiant l'implication d'acteurs encore plus spécifiques serait néanmoins nécessaire. En effet, les acteurs identifiés dans ce travail font partie de voies intracellulaires classiques qui participent à de nombreux processus physiologiques. Toute tentative d'inhibition de l'un de ces acteurs dans le but d'atténuer les signes de la sécheresse oculaire doit être effectuée avec précaution en raison du déséquilibre éventuellement entraîné sur d'autres tissus ou organes, bien que la voie ophtalmique topique diminue ce risque.

L'inhibition des voies intracellulaires que nous avons identifiées font pour certaines déjà l'objet de brevets ou d'essais cliniques dans d'autres pathologie. Ainsi, un brevet a récemment été déposé sur une molécule inhibitrice de NFAT5, un dérivé de la 8-oxoprotobérberine, destinée à prévenir ou à traiter des maladies associées à l'activité de NFAT5, soit des maladies inflammatoires et en particulier la polyarthrite rhumatoïde, cette molécule ayant présenté des effets bénéfiques sur un modèle animal de cette pathologie (WO/2015/102380). Des essais cliniques sont en cours en oncologie utilisant des anticorps anti-CCL2 tels que le carlumab (665). Il existe également des brevets concernant des antagonistes de CCL2, dont des anticorps anti-CCL2, pour traiter des pathologies inflammatoires mais ne mentionnant pas la sécheresse oculaire (WO/2015/062743, WO/2013/177264, WO/2013/144563). Enfin, en ce qui concerne spécifiquement l'inflammation oculaire, notons qu'il existe des brevets déposés sur l'utilisation d'inhibiteurs de JNK (WO/2013/079213 et 2902035) et de p38 (WO/2009/152072, WO/2007/067478). Des essais cliniques sont en cours testant des inhibiteurs de p38 dans d'autres pathologie : RO4402257 ou PH-797804 dans la polyarthrite rhumatoïde, SB681323 dans les douleurs neuropathiques ou VX-745 dans la maladie d'Alzheimer.

Un des intérêts parallèles des expérimentations présentées dans ces travaux est lié à la caractérisation de la sécrétion de CCL2 induite par ce modèle de sécheresse oculaire sur les cellules conjonctivales. Cette induction étant importante et surtout extrêmement reproductible au cours des expérimentations, utiliser ce modèle devient ainsi un outil rapide et peu coûteux permettant de tester l'effet anti-inflammatoire de molécules potentiellement intéressantes pour traiter la sécheresse oculaire. Cela ne dispense pas des études *in vivo* mais permet d'obtenir des pistes préliminaires quant à l'efficacité potentielle de ces molécules et permet également d'adapter par la suite les protocoles expérimentaux *in vivo*.

Les résultats concernant la voie de l'inflammasome présentés dans ce manuscrit sont des résultats préliminaires nécessitant une investigation plus poussée. Ils nous ont cependant permis de montrer que l'hyperosmolarité n'était pas un stimulus activateur de l'inflammasome que ce soit dans les cellules épithéliales conjonctivales ou les cellules monocytaires. En revanche, ce stress hyperosmolaire s'est révélé réduire de manière significative les réponses inflammatoires induites par des activateurs pro-inflammatoires classiques (LPS ou LTA seuls, avec ou sans ATP) sur les monocytes, à la différence d'un stress hypo-osmolaire qui les exacerbe. Nos résultats négatifs quant à la sécrétion d'IL-1 β par les cellules épithéliales conjonctivales en présence d'hyperosmolarité semblent en contradiction avec ceux trouvés par d'autres équipes sur des cellules épithéliales cornéennes en dépit des différentes conditions que nous avons testées : un stress hyperosmolaire plus important (hyperosmolarité forte, temps plus longs), une costimulation avec du LPS ou du LTA et de l'ATP, un prétraitement avec l'IFN- γ ou l'utilisation de milieux conditionnés. En effet, la majorité des études publiées a rapporté une induction d'IL-1 β par l'hyperosmolarité saline sur des cellules cornéennes en lignées immortalisées par SV40, HCE-2 (ATCC) (299,355) ou HCE (446,451), ainsi que sur des cellules primaires cornéennes (248) ou limbiques (235). Pour essayer de lever cette ambiguïté, nous avons voulu vérifier si la lignée cellulaire utilisée était en cause et nous avons ainsi pu confirmer nos résultats négatifs précédents en obtenant les mêmes sur une lignée cornéenne (lignée HCE-T, immortalisée par SV40, RIKEN BioResource Center). Il est important de souligner que ces résultats négatifs sont en concordance avec deux études utilisant des cellules cornéennes primaires et en lignée (HCE immortalisée par SV40) pour l'une (600) et la même lignée cornéenne que nous avons testée pour l'autre (601).

L'ensemble des résultats présentés dans ce travail de thèse serait intéressant à approfondir en étudiant les interactions avec tous les acteurs cellulaires et les structures proches de la conjonctive. Dans ce but, réaliser une coculture de macrophages ou de monocytes avec les cellules conjonctivales permettrait d'analyser et d'identifier les liaisons entre ces acteurs présents au niveau de la surface oculaire. Une coculture dans un système Transwell® permettrait d'identifier la capacité des cellules conjonctivales sous hyperosmolarité à attirer les monocytes ou les macrophages *via* la sécrétion de CCL2 notamment. D'autre part, développer un nouveau modèle *ex vivo* de sécheresse oculaire utilisant des yeux d'animaux mis en culture dans des milieux hyperosmolaires pourrait également permettre de compléter nos données. Il serait alors possible d'effectuer des immunomarquages ou des analyses en RT-qPCR de la cornée et de la conjonctive pour identifier les différents marqueurs pro-inflammatoires augmentés dans ce modèle ainsi que l'effet de différentes thérapies sur ceux-ci. On peut également envisager de récupérer le milieu de culture et d'y doser les différentes chimiokines pro-inflammatoires sécrétées. Les résultats obtenus pourraient être comparés à ceux que nous avons trouvés dans ce travail et notamment l'induction de CCL2.

Notre travail s'inscrit dans la physiopathologie de la maladie décrite par le cercle vicieux (33) de la sécheresse oculaire montrant le rôle actif joué par les cellules épithéliales en réponse à l'hyperosmolarité du film lacrymal. Par la production de la chimiokine pro-inflammatoire CCL2, une molécule chimiotactique de différentes cellules immunitaires ayant un rôle majeur dans l'inflammation, les cellules épithéliales conjonctivales participent à l'entretien de l'inflammation au niveau de la surface oculaire. En outre, l'hyperosmolarité déclenche au niveau intracellulaire la translocation d'un facteur de transcription indispensable à l'osmoprotection, le NFAT5, que nous

avons montré comme responsable de la synthèse de CCL2. Le blocage plus ou moins partiel de ces deux cibles mérite d'être exploré de manière plus approfondie car celles-ci pourraient constituer des opportunités thérapeutiques intéressantes dans l'avenir.

ANNEXE

Ocular Surface Disease Index (OSDI)

Posez aux patients les 12 questions suivantes et entourez la case dont le chiffre représente le mieux chaque réponse. Puis remplissez les cases A, B, C, D et E selon les instructions.

Avez-vous ressenti l'une des situations suivantes la semaine passées ?	Tout le temps	La plupart du temps	La moitié du temps	De temps en temps	Jamais
1. Les yeux qui sont sensible à la lumière ?	4	3	2	1	0
2. Un sensation de gravier dans les yeux ?	4	3	2	1	0
3. Les yeux douloureux ?	4	3	2	1	0
4. Une vision floue ?	4	3	2	1	0
5. Une mauvaise vision ?	4	3	2	1	0

Total des réponses 1 à 5

A =

Avez-vous eu des problèmes avec vos yeux qui vous ont limité dans les situations suivantes la semaine passée ?	Tout le temps	La plupart du temps	La moitié du temps	De temps en temps	Jamais	Sans réponse N/A
6. La lecture ?	4	3	2	1	0	N/A
7. La conduite de nuit ?	4	3	2	1	0	N/A
8. Travailler sur ordinateur ?	4	3	2	1	0	N/A
9. Regarder la télévision ?	4	3	2	1	0	N/A

Total des réponses 6 à 9

B =

Est-ce que vos yeux ont été inconfortables dans l'une des situations suivantes la semaine passée ?	Tout le temps	La plupart du temps	La moitié du temps	De temps en temps	Jamais	Sans réponse N/A
10. Dans des conditions de vent ?	4	3	2	1	0	N/A
11. Lieux avec très peu d'humidité (très sec) ?	4	3	2	1	0	N/A
12. Lieux avec air conditionnée ?	4	3	2	1	0	N/A

Total des réponses 10 à 12

C =

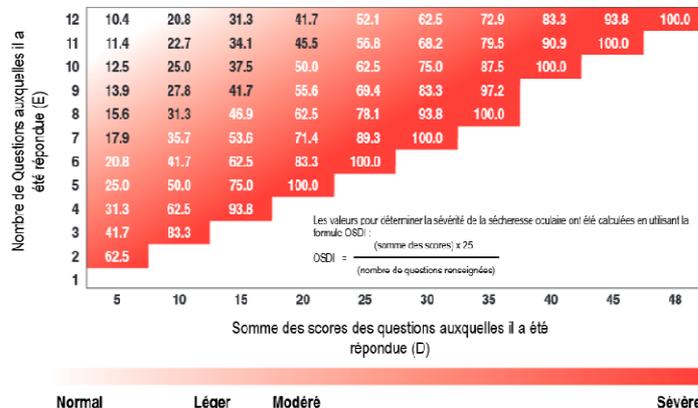
Faire le total des cases A, B et C

D = /48

Total des questions répondues sur les 12

E = /12

Se référer au tableau pour connaître le statut du patient : normal, syndrome sec léger, modéré ou sévère



Annexe : Questionnaire OSDI.

RÉFÉRENCES

1. Pisella P, Baudouin C, Hoang-Xuan T. Surface oculaire. Rapport 2015 de la Société Française d'Ophtalmologie. Elsevier M. Issy-les-Moulineaux; 2015.
2. DEWS. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf.* 2007;5(2):75–92.
3. Chia E-M, Mitchell P, Rochtchina E, Lee AJ, Maroun R, Wang JJ. Prevalence and associations of dry eye syndrome in an older population: the Blue Mountains Eye Study. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2003;31(3):229–32.
4. Clegg JP, Guest JF, Lehman A, Smith AF. The annual cost of dry eye syndrome in France, Germany, Italy, Spain, Sweden and the United Kingdom among patients managed by ophthalmologists. *Ophthalmic Epidemiol.* 2006;13(4):263–74.
5. Yu J, Asche C V, Fairchild CJ. The economic burden of dry eye disease in the United States: a decision tree analysis. *Cornea.* 2011;30(4):379–87.
6. Goto E, Yagi Y, Matsumoto Y, Tsubota K. Impaired functional visual acuity of dry eye patients. *Am J Ophthalmol.* 2002;133(2):181–6.
7. Bron AJ, Tomlinson A, Foulks GN, Pepose JS, Baudouin C, Geerling G, et al. Rethinking dry eye disease: a perspective on clinical implications. *Ocul Surf.* 2014;12(2 Suppl):S1–31.
8. Miljanović B, Dana R, Sullivan D a., Schaumberg D a. Impact of Dry Eye Syndrome on Vision-Related Quality of Life. *Am J Ophthalmol.* 2007;143(3):409–15.
9. Labbé A, Wang YX, Jie Y, Baudouin C, Jonas JB, Xu L. Dry eye disease, dry eye symptoms and depression: the Beijing Eye Study. *Br J Ophthalmol.* 2013;97(11):1399–403.
10. Doughty MJ, Fonn D, Richter D, Simpson T, Caffery B, Gordon K. A patient questionnaire approach to estimating the prevalence of dry eye symptoms in patients presenting to optometric practices across Canada. *Optom Vis Sci.* 1997;74(8):624–31.
11. Rolando M, Zierhut M. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. *Surv Ophthalmol.* 2001 Mar;45 Suppl 2:S203–10.
12. Holly FJ. Physical chemistry of the normal and disordered tear film. *Trans Ophthalmol Soc U K.* 1985 Jan;104:374–80.
13. Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, Gao J, Mircheff AK, Pflugfelder SC. The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea.* 1998;17(6):584–9.
14. Stern ME, Gao J, Siemasko KF, Beuerman RW, Pflugfelder SC. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp Eye Res.* 2004;78(3):409–16.
15. Dartt DA. Regulation of mucin and fluid secretion by conjunctival epithelial cells. *Prog Retin Eye Res.* 2002;21(6):555–76.
16. Willcox MDP. Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. *Exp Eye Res.* 2013;117:99–105.
17. Prydal JI, Artal P, Woon H, Campbell FW. Study of human precorneal tear film thickness and structure using laser interferometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992;33(6):2006–11.
18. Prydal JI, Campbell FW. Study of precorneal tear film thickness and structure by interferometry and confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992 May;33(6):1996–2005.
19. Tiffany JM. The normal tear film. *Developments in ophthalmology.* 2008. 1-20 p.
20. Holly FJ. Tear film physiology. *Am J Optom Physiol Opt.* 1980 Apr;57(4):252–7.
21. Cher I. Fluids of the ocular surface: concepts, functions and physics. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2012 Aug;40(6):634–43.
22. Ohashi Y, Dogru M, Tsubota K. Laboratory findings in tear fluid analysis. *Clin Chim Acta.* 2006;369(1):17–28.
23. Creuzot-Garcher C. Lacrimal film and the ocular surface. *J Fr Ophtalmol.* 2006;29(9):1053–9.
24. Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res.* 2004 Mar;78(3):347–60.

25. McCulley JP, Shine WE. The lipid layer of tears: dependent on meibomian gland function. *Exp Eye Res.* 2004;78(3):361–5.
26. Butovich IA. Tear film lipids. *Exp Eye Res.* 2013;117:4–27.
27. Tsai PS, Evans JE, Green KM, Sullivan RM, Schaumberg DA, Richards SM, et al. Proteomic analysis of human meibomian gland secretions. *Br J Ophthalmol.* 2006;90(3):372–7.
28. Shine WE, McCulley JP. Polar lipids in human meibomian gland secretions. *Curr Eye Res.* 2003;26(2):89–94.
29. McCulley JP, Shine WE. The lipid layer: the outer surface of the ocular surface tear film. *Biosci Rep.* 2001 Aug;21(4):407–18.
30. Nakamura Y, Sotozono C, Kinoshita S. Inflammatory cytokines in normal human tears. *Curr Eye Res.* 1998 Jun;17(6):673–6.
31. Van Haeringen NJ. Clinical biochemistry of tears. *Surv Ophthalmol.* 1981;26(2):84–96.
32. Labbé A, Brignole-Baudouin F, Baudouin C. Ocular surface investigations in dry eye. *J Fr Ophtalmol.* 2007 Jan;30(1):76–97.
33. Baudouin C. A new approach for better comprehension of diseases of the ocular surface. *J Fr Ophtalmol.* 2007;30(3):239–46.
34. Johnson ME, Murphy PJ. Changes in the tear film and ocular surface from dry eye syndrome. *Prog Retin Eye Res.* 2004;23(4):449–74.
35. Tiffany JM, Nagyová B. The role of lipocalin in determining the physical properties of tears. *Adv Exp Med Biol.* 2002;506(Pt A):581–5.
36. Gachon AM, Lacazette E. Tear lipocalin and the eye's front line of defence. *Br J Ophthalmol.* 1998;82(4):453–5.
37. Tisato V, Perri P, Rimondi E, Melloni E, Lamberti G, Milani D, et al. Kinetic Profiles of Inflammatory Mediators in the Conjunctival Sac Fluid of Patients upon Photorefractive Keratectomy. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:942948.
38. Gipson IK, Hori Y, Argüeso P. Character of ocular surface mucins and their alteration in dry eye disease. *Ocul Surf.* 2004;2(2):131–48.
39. Dartt DA. Control of mucin production by ocular surface epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2004;78(2):173–85.
40. Gipson IK. Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res.* 2004;78(3):379–88.
41. Solomon A, Rosenblatt M, Li DQ, Liu Z, Monroy D, Ji Z, et al. Doxycycline inhibition of interleukin-1 in the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(9):2544–57.
42. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol.* 1986;103(1):49–62.
43. Majo F, Rochat A, Nicolas M, Jaoudé GA, Barrandon Y. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature.* 2008;456(7219):250–4.
44. Chandler JW, Gillette TE. Immunologic defense mechanisms of the ocular surface. *Ophthalmology.* 1983 Jun;90(6):585–91.
45. Brignole F, Pisella P, De Saint Jean M, Goldschild M, Goguel A, Baudouin C. Flow Cytometric Analysis of Inflammatory Markers in KCS: 6-Month Treatment with Topical Cyclosporin A. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(1):90–5.
46. Knop N, Knop E. Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(6):1270–9.
47. Franklin RM, Remus LE. Conjunctival-associated lymphoid tissue: evidence for a role in the secretory immune system. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1984 Feb;25(2):181–7.
48. Pedler C. The fine structure of the corneal epithelium. *Exp Eye Res.* 1962 Mar;1:286–9.
49. Patel S, McLaren J, Hodge D, Bourne W. Normal human keratocyte density and corneal thickness measurement by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(2):333–9.
50. Zhivov A, Stave J, Vollmar B, Guthoff R. In vivo confocal microscopic evaluation of langerhans cell density and distribution in the corneal epithelium of healthy volunteers and contact lens wearers. *Cornea.* 2007;26(1):47–54.

51. Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. *CLAO J.* 1995;21(4):221–32.
52. Nichols KK, Nichols JJ, Mitchell GL. The lack of association between signs and symptoms in patients with dry eye disease. *Cornea.* 2004 Nov;23(8):762–70.
53. Mccarty C a, Bansal AK, Livingston PM, Stanislausky YL, Taylor HR. The Epidemiology of Dry Eye in Melbourne, Australia. *Ophthalmology.* 1998;105(6):1114–9.
54. Lin PY, Tsai SY, Cheng CY, Liu JH, Chou P, Hsu WM. Prevalence of dry eye among an elderly Chinese population in Taiwan: The Shihpai eye study. *Ophthalmology.* 2003;110(6):1096–101.
55. Schein OD, Muñoz B, Tielsch JM, Bandeen-Roche K, West S. Prevalence of dry eye among the elderly. *Am J Ophthalmol.* 1997;124(6):723–8.
56. Paulsen A, Cruickshanks K, Fischer M, Huang G, Klein B, Klein R, et al. Dry eye in the beaver dam offspring study: prevalence, risk factors, and health-related quality of life. *Am J Ophthalmol.* 2014;157(4):799–806.
57. Sharma A, Hindman HB. Aging: a predisposition to dry eyes. *J Ophthalmol.* 2014;2014:781683.
58. Schaumberg DA, Buring JE, Sullivan DA, Dana MR. Hormone replacement therapy and dry eye syndrome. *JAMA.* 2001;286(17):2114–9.
59. Miljanović B, Trivedi KA, Dana MR, Gilbard JP, Buring JE, Schaumberg DA. Relation between dietary n-3 and n-6 fatty acids and clinically diagnosed dry eye syndrome in women. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(4):887–93.
60. Sommer A. Vitamin A deficiency and the global response. *Forum Nutr.* 2003;56:33–5.
61. Hovanesian JA, Shah SS, Maloney RK. Symptoms of dry eye and recurrent erosion syndrome after refractive surgery. *J Cataract Refract Surg.* 2001;27(4):577–84.
62. Garcia-Zalznak D, Nash D, Yeu E. Ocular surface diseases and corneal refractive surgery. *Curr Opin Ophthalmol.* 2014;25(4):264–9.
63. De Paiva CS, Chen Z, Koch DD, Hamill MB, Manuel FK, Hassan SS, et al. The incidence and risk factors for developing dry eye after myopic LASIK. *Am J Ophthalmol.* 2006;141(3):438–45.
64. Ogawa Y, Kuwana M. Dry eye as a major complication associated with chronic graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Cornea.* 2003;22(7 suppl):S19–27.
65. Guo B, Lu P, Chen X, Zhang W, Chen R. Prevalence of dry eye disease in Mongolians at high altitude in China: the Henan eye study. *Ophthalmic Epidemiol.* 2010;17(4):234–41.
66. Rios JL de M, Boechat JL, Gioda A, dos Santos CY, de Aquino Neto FR, Lapa e Silva JR. Symptoms prevalence among office workers of a sealed versus a non-sealed building: associations to indoor air quality. *Environ Int.* 2009;35(8):1136–41.
67. Blehm C, Vishnu S, Khattak A, Mitra S, Yee RW. Computer vision syndrome: a review. *Surv Ophthalmol.* Jan;50(3):253–62.
68. Farris RL. The dry eye: its mechanisms and therapy, with evidence that contact lens is a cause. *CLAO J.* 1986;12(4):234–46.
69. Nichols JJ, Sinnott LT. Tear film, contact lens, and patient-related factors associated with contact lens-related dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006 Apr;47(4):1319–28.
70. 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 Jul;29(4):312–34.
71. Ishibashi T, Yokoi N, Kinoshita S. Comparison of the short-term effects on the human corneal surface of topical timolol maleate with and without benzalkonium chloride. *J Glaucoma.* 2003;12(6):486–90.
72. Nuzzi R, Finazzo C, Cerruti A. Adverse effects of topical antiglaucomatous medications on the conjunctiva and the lachrymal (Brit. Engl) response. *Int Ophthalmol.* 1998;22(1):31–5.
73. 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(3):341–9.
74. De Jong C, Stolwijk T, Kuppens E, de Keizer R, van Best J. Topical timolol with and without benzalkonium chloride: epithelial permeability and autofluorescence of the cornea in glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1994;32(4):221–4.

75. Costagliola C, Prete AD, 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(11):809–14.
76. Pisella PJ, Fillacier K, Elena PP, Debbasch C, Baudouin C. Comparison of the effects of preserved and unpreserved formulations of timolol on the ocular surface of albino rabbits. *Ophthalmic Res*. 2000;32(1):3–8.
77. Wilson WS, Duncan AJ, Jay JL. Effect of benzalkonium chloride on the stability of the precorneal tear film in rabbit and man. *Br J Ophthalmol*. 1975;59(11):667–9.
78. 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(4):419–25.
79. 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(3):339–43.
80. Zhang Z, Yang W-Z, Zhu Z-Z, Hu Q-Q, Chen Y-F, He H, et al. Therapeutic effects of topical doxycycline in a benzalkonium chloride-induced mouse dry eye model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(5):2963–74.
81. Beyazyıldız E, Acar U, Beyazyıldız Ö, Pınarlı FA, Albayrak A, Uğurlu N, et al. Comparison of prednisolone acetate and loteprednol etabonate for the treatment of benzalkonium chloride-induced dry eye syndrome in rats. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2014;30(4):306–12.
82. Chou A, Hori S, Takase M. Ocular toxicity of beta-blockers and benzalkonium chloride in pigmented rabbits: electrophysiological and morphological studies. *Jpn J Ophthalmol*. 1985;29(1):13–23.
83. Sarkar J, Chaudhary S, Namavari A, Ozturk O, Chang J-H, Yco L, et al. Corneal neurotoxicity due to topical benzalkonium chloride. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(4):1792–802.
84. Pisella P, Debbasch C, Hamard P, Creuzot-Garcher C, Rat P, Brignole F, et al. Conjunctival Proinflammatory and Proapoptotic Effects of Latanoprost and Preserved and Unpreserved Timolol: An Ex Vivo and In Vitro Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(5):1360–8.
85. 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(3):619–30.
86. Kang S, Ha S, Kim E, Shin J, Kim JY, Tchah H. Effect of Nerve Growth Factor on the In Vitro Induction of Apoptosis of Human Conjunctival Epithelial Cells by Hyperosmolar Stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(1):535–41.
87. 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(5):415–24.
88. 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(3):642–52.
89. Tincani A, Andreoli L, Cavazzana I, Doria A, Favero M, Fenini M-G, et al. Novel aspects of Sjögren's syndrome in 2012. *BMC Med*. 2013;11(1):93.
90. Pisella PJ, Creuzot-Garcher C, Baudouin C. Current aspects of Gougerot-Sjögren syndrome. *J Fr Ophtalmol*. 1999;22(8):889–92.
91. Espana EM, Shah S, Santhiago MR, Singh AD. Graft versus host disease: clinical evaluation, diagnosis and management. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2013;251(5):1257–66.
92. Mathers WD, Lane JA, Zimmerman MB. Tear film changes associated with normal aging. *Cornea*. 1996;15(3):229–34.
93. Obata H, Yamamoto S, Horiuchi H, Machinami R. Histopathologic study of human lacrimal gland. Statistical analysis with special reference to aging. *Ophthalmology*. 1995;102(4):678–86.
94. Tang NE, Zuure PL, Pardo RD, de Keizer RJ, Van Best JA. Reflex lacrimation in patients with glaucoma and healthy control subjects by fluorophotometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(3):709–14.
95. Gilbard JP, Gray KL, Rossi SR. A proposed mechanism for increased tear-film osmolarity in contact lens wearers. *Am J Ophthalmol*. 1986;102(4):505–7.
96. Semeraro F, Forbice E, Romano V, Angi M, Romano MR, Filippelli ME, et al. Neurotrophic keratitis. *Ophthalmologica*. 2014;231(4):191–7.

97. Nelson JD, Shimazaki J, Benitez-del-Castillo JM, Craig JP, McCulley JP, Den S, et al. The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the definition and classification subcommittee. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(4):1930–7.
98. Schaumberg DA, Nichols JJ, Papas EB, Tong L, Uchino M, Nichols KK. The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on the epidemiology of, and associated risk factors for, MGD. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(4):1994–2005.
99. Tsubota K, Nakamori K. Effects of ocular surface area and blink rate on tear dynamics. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960).* 1995;113(2):155–8.
100. Nakamori K, Odawara M, Nakajima T, Mizutani T, Tsubota K. Blinking is controlled primarily by ocular surface conditions. *Am J Ophthalmol.* 1997;124(1):24–30.
101. Rocha EM, Mantelli F, Nominato LF, Bonini S. Hormones and dry eye syndrome: an update on what we do and don't know. *Curr Opin Ophthalmol.* 2013;24(4):348–55.
102. Hom MM, Nguyen AL, Bielory L. Allergic conjunctivitis and dry eye syndrome. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2012;108(3):163–6.
103. Friedman NJ. Impact of dry eye disease and treatment on quality of life. *Curr Opin Ophthalmol.* 2010;21(4):310–6.
104. Zeev MS-B, Miller DD, Laskany R. Diagnosis of dry eye disease and emerging technologies. *Clin Ophthalmol.* 2014;20(8):581–90.
105. Abelson MB, Ousler GW, Nally LA, Welch D, Krenzer K. Alternative reference values for tear film break up time in normal and dry eye populations. *Adv Exp Med Biol.* 2002;506:1121–5.
106. Sweeney DF, Millar TJ, Raju SR. Tear film stability: a review. *Exp Eye Res.* 2013;117:28–38.
107. Pflugfelder SC, Tseng SC, Sanabria O, Kell H, Garcia CG, Felix C, et al. Evaluation of subjective assessments and objective diagnostic tests for diagnosing tear-film disorders known to cause ocular irritation. *Cornea.* 1998 Jan;17(1):38–56.
108. Bron AJ, Evans VE, Smith JA. Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests. *Cornea.* 2003;22(7):640–50.
109. Creuzot-Garcher C. Clinical examination of the lacrimal film. *J Fr Ophtalmol.* 1999;22(4):461–6.
110. Ogawa Y, Kim SK, Dana R, Clayton J, Jain S, Rosenblatt MI, et al. International Chronic Ocular Graft-vs-Host-Disease (GVHD) Consensus Group: proposed diagnostic criteria for chronic GVHD (Part I). *Sci Rep.* 2013;3:3419.
111. Farris RL. Tear osmolarity--a new gold standard? *Adv Exp Med Biol.* 1994;350:495–503.
112. Foulks GN, Pflugfelder SC. New testing options for diagnosing and grading dry eye disease. *Am J Ophthalmol.* 2014;157(6):1122–9.
113. McGinnigle S, Naroo SA, Eperjesi F. Evaluation of dry eye. *Surv Ophthalmol.* 2012;57(4):293–316.
114. Sullivan BD, Crews LA, Sönmez B, de la Paz MF, Comert E, Charoenrook V, et al. Clinical utility of objective tests for dry eye disease: variability over time and implications for clinical trials and disease management. *Cornea.* 2012;31(9):1000–8.
115. Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, Diaper C, McFadyen A. Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006 Oct;47(10):4309–15.
116. Bunya VY, Fuerst NM, Pistilli M, McCabe BE, Salvo R, Macchi I, et al. Variability of Tear Osmolarity in Patients With Dry Eye. *JAMA Ophthalmol.* 2015 Jun;133(6):662–7.
117. Keech A, Senchyna M, Jones L. Impact of time between collection and collection method on human tear fluid osmolarity. *Curr Eye Res.* 2013;38(4):428–36.
118. Ohashi Y, Ishida R, Kojima T, Goto E, Matsumoto Y, Watanabe K, et al. Abnormal protein profiles in tears with dry eye syndrome. *Am J Ophthalmol.* 2003;136(2):291–9.
119. Lopin E, Deveney T, Asbell PA. Impression cytology: recent advances and applications in dry eye disease. *Ocul Surf.* 2009;7(2):93–110.
120. 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(7):1458–64.

121. Brignole F, Pisella P, Goldschild M, Jean MD Saint, Goguel A, Baudouin C. Flow Cytometric Analysis of Inflammatory Markers in Conjunctival Epithelial Cells of Patients with Dry Eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(6):1356–63.
122. Pisella P, Brignole F, Debbasch C, Lozato P, Creuzot-garcher C, Bara J, et al. Flow Cytometric Analysis of Conjunctival Epithelium in Ocular Rosacea and Keratoconjunctivis Sicca. *Ophthalmology.* 2000;101(10):1841–9.
123. 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 Dec;67(6):687–97.
124. Doane MG. An instrument for in vivo tear film interferometry. *Optom Vis Sci.* 1989;66(6):383–8.
125. Mathers WD. Ocular evaporation in meibomian gland dysfunction and dry eye. *Ophthalmology.* 1993;100(3):347–51.
126. Kojima T, Matsumoto Y, Dogru M, Tsubota K. The application of in vivo laser scanning confocal microscopy as a tool of conjunctival in vivo cytology in the diagnosis of dry eye ocular surface disease. *Mol Vis.* 2010;16:2457–64.
127. Begley CG, Chalmers RL, Abetz L, Venkataraman K, Mertzanis P, Caffery BA, et al. The relationship between habitual patient-reported symptoms and clinical signs among patients with dry eye of varying severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(11):4753–61.
128. Behrens A, Doyle JJ, Stern L, Chuck RS, McDonnell PJ, Azar DT, et al. Dysfunctional tear syndrome: a Delphi approach to treatment recommendations. *Cornea.* 2006;25(8):900–7.
129. Labetoulle M, Baudouin C. From pathogenic considerations to a simplified decision-making schema in dry eye disease. *J Fr Ophtalmol.* 2013;36(6):543–7.
130. Creuzot C, Passemard M, Viau S, Joffre C, Pouliquen P, Elena PP, et al. Improvement of dry eye symptoms with polyunsaturated fatty acids. *J Fr Ophtalmol.* 2006;29(8):868–73.
131. Creuzot-Garcher C, Baudouin C, Labetoulle M, Pisella P-J, Mouriaux F, Meddeb-Ouertani A, et al. Efficacy assessment of Nutrilarm®, a per os omega-3 and omega-6 polyunsaturated essential fatty acid dietary formulation versus placebo in patients with bilateral treated moderate dry eye syndrome. *J Fr Ophtalmol.* 2011;34(7):448–55.
132. Diebold Y, Herreras JM, Callejo S, Argüeso P, Calonge M. Carbomer- versus cellulose-based artificial-tear formulations: morphologic and toxicologic effects on a corneal cell line. *Cornea.* 1998;17(4):433–40.
133. Shimmura S, Ono M, Shinozaki K, Toda I, Takamura E, Mashima Y, et al. Sodium hyaluronate eyedrops in the treatment of dry eyes. *Br J Ophthalmol.* 1995;79(11):1007–11.
134. Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI. Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev.* 2007;87(4):1441–74.
135. Tauber J, Davitt WF, Bokosky JE, Nichols KK, Yerxa BR, Schaberg AE, et al. Double-masked, placebo-controlled safety and efficacy trial of diquafosol tetrasodium (INS365) ophthalmic solution for the treatment of dry eye. *Cornea.* 2004;23(8):784–92.
136. Balam M, Schaumberg DA, Dana MR. Efficacy and tolerability outcomes after punctal occlusion with silicone plugs in dry eye syndrome. *Am J Ophthalmol.* 2001;131(1):30–6.
137. Hamano T. Lacrimal duct occlusion for the treatment of dry eye. *Semin Ophthalmol.* 2005 Jan;20(2):71–4.
138. Dursun D, Ertan A, Bilezikçi B, Akova YA, Pelit A. Ocular surface changes in keratoconjunctivitis sicca with silicone punctum plug occlusion. *Curr Eye Res.* 2003;26(5):263–9.
139. Romero-Rangel T, Stavrou P, Cotter J, Rosenthal P, Baltatzis S, Foster CS. Gas-permeable scleral contact lens therapy in ocular surface disease. *Am J Ophthalmol.* 2000;130(1):25–32.
140. Wander AH, Koffler BH. Extending the duration of tear film protection in dry eye syndrome: review and retrospective case series study of the hydroxypropyl cellulose ophthalmic insert. *Ocul Surf.* 2009;7(3):154–62.
141. Quinto GG, Campos M, Behrens A. Autologous serum for ocular surface diseases. *Arq Bras Oftalmol.* 2008;71(6 Suppl):47–54.
142. Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol.* 1999;83(4):390–5.
143. Kojima T, Ishida R, Dogru M, Goto E, Matsumoto Y, Kaido M, et al. The effect of autologous serum eyedrops in the treatment of severe dry eye disease: a prospective randomized case-control study. *Am J Ophthalmol.* 2005;139(2):242–6.

144. Jirsova K, Brejchova K, Krabcova I, Filipec M, Al Fakih A, Palos M, et al. The application of autologous serum eye drops in severe dry eye patients; subjective and objective parameters before and after treatment. *Curr Eye Res.* 2014;39(1):21–30.
145. Gumus K, Cavanagh DH. The role of inflammation and antiinflammation therapies in keratoconjunctivitis sicca. *Clin Ophthalmol.* 2009;3:57–67.
146. Dmitrieva N, Kultz D, Michea L, Ferraris J, Burg M. Protection of renal inner medullary epithelial cells from apoptosis by hypertonic stress-induced p53 activation. *J Biol Chem.* 2000;275(24):18243–7.
147. Kültz D, Chakravarty D. Hyperosmolality in the form of elevated NaCl but not urea causes DNA damage in murine kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(4):1999–2004.
148. Burg MB, Ferraris JD. Intracellular organic osmolytes: function and regulation. *J Biol Chem.* 2008 Mar;283(12):7309–13.
149. Lang F, Busch GL, Ritter M, Völkl H, Waldegger S, Gulbins E, et al. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev.* 1998 Jan;78(1):247–306.
150. Dmitrieva NI, Michea LF, Rocha GM, Burg MB. Cell cycle delay and apoptosis in response to osmotic stress. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2001 Oct;130(3):411–20.
151. Dmitrieva NI, Burg MB. Hypertonic stress response. *Mutat Res.* 2005;569(1-2):65–74.
152. Arsenijevic T, Vujovic A, Libert F, Op de Beeck A, Hébrant A, Janssens S, et al. Hyperosmotic stress induces cell cycle arrest in retinal pigmented epithelial cells. *Cell Death Dis.* 2013;4:e662.
153. Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science (80-).* 1982;217(4566):1214–22.
154. Wehner F, Olsen H, Tinel H, Kinne-Saffran E, Kinne RKH. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003;148:1–80.
155. Cheung CYK, Ko BCB. NFAT5 in cellular adaptation to hypertonic stress – regulations and functional significance. *J Mol Signal.* 2013;8(5):1–9.
156. Dmitrieva NI, Cai Q, Burg MB. Cells adapted to high NaCl have many DNA breaks and impaired DNA repair both in cell culture and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(8):2317–22.
157. Kunin M, Dmitrieva NI, Gallazzini M, Shen R-F, Wang G, Burg MB, et al. Mediator of DNA Damage Checkpoint 1 (MDC1) Contributes to High NaCl-Induced Activation of the Osmoprotective Transcription Factor TonEBP/OREBP. *PLoS One.* 2010;5(8):e12108.
158. Kültz D, Madhany S, Burg MB. Hyperosmolality causes growth arrest of murine kidney cells. Induction of GADD45 and GADD153 by osmosensing via stress-activated protein kinase 2. *J Biol Chem.* 1998;273(22):13645–51.
159. Kyriakis JM, Avruch J. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *BioEssays.* 1996;18(7):567–77.
160. Hattori K, Naguro I, Runchel C, Ichijo H. The roles of ASK family proteins in stress responses and diseases. *Cell Commun Signal.* 2009 Jan;24(7):9.
161. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature.* 2000;408(6811):433–9.
162. Yang T, Zhang A, Honeggar M, Kohan DE, Mizel D, Sanders K, et al. Hypertonic induction of COX-2 in collecting duct cells by reactive oxygen species of mitochondrial origin. *J Biol Chem.* 2005;280(41):34966–73.
163. Zhang Z, Dmitrieva NI, Park J-H, Levine RL, Burg MB. High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and in vivo, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(25):9491–6.
164. Zhou X, Ferraris J, Burg M. Mitochondrial reactive oxygen species contribute to high NaCl-induced activation of the transcription factor TonEBP/OREBP. *AJP Ren Physiol.* 2006;290(5):F1169–76.
165. Hua X, Deng R, Li J, Chi W, Su Z, Lin J, et al. Protective Effects of L-Carnitine Against Oxidative Injury by Hyperosmolality in Human Corneal Epithelial Cells. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2015;56(9):5503.
166. Zhang Z, Yang XY, Cohen DM. Urea-associated oxidative stress and Gadd153/CHOP induction. *Am J Physiol.* 1999;276(5 Pt 2):F786–93.

167. Hoffmann EK, Lambert IANH, Pedersen SF. Physiology of Cell Volume Regulation in Vertebrates. *Physiol Rev.* 2009;89(1):193–277.
168. Wehner F. Cell volume-regulated cation channels. *Contrib Nephrol.* 2006 Jan;152:25–53.
169. Gillis D, Shrode LD, Krump E, Howard CM, Rubie EA, Tibbles LA, et al. Osmotic stimulation of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1: relationship to the activation of three MAPK pathways. *J Membr Biol.* 2001;181(3):205–14.
170. Grinstein S, Woodside M, Sardet C, Pouyssegur J, Rotin D. Activation of the Na⁺/H⁺ antiporter during cell volume regulation. Evidence for a phosphorylation-independent mechanism. *J Biol Chem.* 1992;267(33):23823–8.
171. Bildin VN, Yang H, Crook RB, Fischbarg J, Reinach PS. Adaptation by corneal epithelial cells to chronic hypertonic stress depends on upregulation of Na:K:2Cl cotransporter gene and protein expression and ion transport activity. *J Membr Biol.* 2000;177(1):41–50.
172. Capó-Aponte JE, Wang Z, Bildin VN, Pokorny KS, Reinach PS. Fate of hypertonicity-stressed corneal epithelial cells depends on differential MAPK activation and p38MAPK/Na-K-2Cl cotransporter1 interaction. *Exp Eye Res.* 2007;84(2):361–72.
173. Koch J, Korbmacher C. Osmotic shrinkage activates nonselective cation (NSC) channels in various cell types. *J Membr Biol.* 1999;168(2):131–9.
174. Böhmer C, Wehner F. The epithelial Na⁽⁺⁾ channel (ENaC) is related to the hypertonicity-induced Na⁽⁺⁾ conductance in rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 2001;494(1-2):125–8.
175. Plettenberg S, Weiss EC, Lemor R, Wehner F. Subunits alpha, beta and gamma of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) are functionally related to the hypertonicity-induced cation channel (HICC) in rat hepatocytes. *Pflugers Arch.* 2008;455(6):1089–95.
176. Pan Z, Wang Z, Yang H, Zhang F, Reinach PS. TRPV1 activation is required for hypertonicity-stimulated inflammatory cytokine release in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(1):485–93.
177. Li C, Wang W, Summer SN, Cadnapaphornchai MA, Falk S, Umenishi F, et al. Hyperosmolality in vivo upregulates aquaporin 2 water channel and Na-K-2Cl co-transporter in Brattleboro rats. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(6):1657–64.
178. Ma W, Quirion R. Inflammatory mediators modulating the transient receptor potential vanilloid 1 receptor: therapeutic targets to treat inflammatory and neuropathic pain. *Expert Opin Ther Targets.* 2007;11(3):307–20.
179. Bildin VN, Wang Z, Iserovich P, Reinach PS. Hypertonicity-induced p38MAPK activation elicits recovery of corneal epithelial cell volume and layer integrity. *J Membr Biol.* 2003;193(1):1–13.
180. Jennings ML, Schulz RK. Okadaic acid inhibition of KCl cotransport. Evidence that protein dephosphorylation is necessary for activation of transport by either cell swelling or N-ethylmaleimide. *J Gen Physiol.* 1991 Apr;97(4):799–817.
181. Capó-Aponte JE, Wang Z, Bildin VN, Iserovich P, Pan Z, Zhang F, et al. Functional and molecular characterization of multiple K-Cl cotransporter isoforms in corneal epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2007;84(6):1090–103.
182. d'Anglemont de Tassigny A, Souktani R, Ghaleh B, Henry P, Berdeaux A. Structure and pharmacology of swelling-sensitive chloride channels, I(Cl,swell). *Fundam Clin Pharmacol.* 2003;17(5):539–53.
183. Sabirov RZ, Dutta AK, Okada Y. Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. *J Gen Physiol.* 2001;118(3):251–66.
184. Shennan DB. Swelling-induced taurine transport: relationship with chloride channels, anion-exchangers and other swelling-activated transport pathways. *Cell Physiol Biochem.* 2008;21(1-3):15–28.
185. Krueger B, Schlötzer-Schrehardt U, Haerteis S, Zenkel M, Chankiewicz VE, Amann KU, et al. Four subunits ($\alpha\beta\gamma\delta$) of the epithelial sodium channel (ENaC) are expressed in the human eye in various locations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(2):596–604.
186. Mirshahi M, Nicolas C, Mirshahi S, Golestaneh N, D'Hermies F, Agarwal MK. Immunohistochemical analysis of the sodium channel in rodent and human eye. *Exp Eye Res.* 1999;69(1):21–32.
187. Mirshahi M, Mirshahi S, Golestaneh N, Nicolas C, Mishal Z, Lounes KC, et al. Mineralocorticoid hormone signaling regulates the “epithelial sodium channel” in fibroblasts from human cornea. *Ophthalmic Res.* 2001;33(1):7–19.
188. Mergler S, Garreis F, Sahlmüller M, Lyras E-M, Reinach PS, Dwarakanath A, et al. Calcium regulation by thermo- and osmosensing transient receptor potential vanilloid channels (TRPVs) in human conjunctival epithelial cells. *Histochem Cell Biol.* 2012;137(6):743–61.

189. Zhang F, Yang H, Wang Z, Mergler S, Liu H, Kawakita T, et al. Transient receptor potential vanilloid 1 activation induces inflammatory cytokine release in corneal epithelium through MAPK signaling. *J Cell Physiol.* 2007;213(3):730–9.
190. Bildin V, Yang H, Fischbarg J, Reinach P. Effects of chronic hypertonic stress on regulatory volume increase and Na-K-2Cl cotransporter expression in cultured corneal epithelial cells. *Adv Exp Med Biol.* 1998;438:637–42.
191. Verkman AS, Ruiz-Ederra J, Levin MH. Functions of aquaporins in the eye. *Prog Retin Eye Res.* 2008;27(4):420–33.
192. Day RE, Kitchen P, Owen DS, Bland C, Marshall L, Conner AC, et al. Human aquaporins: regulators of transcellular water flow. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(5):1492–506.
193. Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, Uchida S, Kuwahara M, Saito H, et al. Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(14):6269–73.
194. Umenishi F, Schrier RW. Hypertonicity-induced Aquaporin-1 (AQP1) Expression Is Mediated by the Activation of MAPK Pathways and Hypertonicity-responsive Element in the AQP1 Gene. *J Biol Chem.* 2003;278(18):15765–70.
195. Hoffert JD, Leitch V, Agre P, King LS. Hypertonic induction of aquaporin-5 expression through an ERK-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2000;275(12):9070–7.
196. Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y. Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. *Prog Histochem Cytochem.* 2004;39(1):1–83.
197. Sun J, Liu C, Zhang Y, Ang H. Effect of cyclosporin A eye drop on keratoconjunctivitis sicca and its mechanism. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2005;25(6):738–40.
198. Moore M, Ma T, Yang B, Verkman A. Tear Secretion by Lacrimal Glands in Transgenic Mice Lacking Water Channels AQP1, AQP3, AQP4 and AQP5. *Exp Eye Res.* 2000;70(5):557–62.
199. Ferraris JD, Williams CK, Persaud P, Zhang Z, Chen Y, Burg MB. Activity of the TonEBP/OREBP transactivation domain varies directly with extracellular NaCl concentration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(2):739–44.
200. Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(5):2538–42.
201. Hollborn M, Vogler S, Reichenbach A, Wiedemann P, Bringmann A, Kohlen L. Regulation of the hyperosmotic induction of aquaporin 5 and VEGF in retinal pigment epithelial cells: Involvement of NFAT5. *Mol Vis.* 2015;28:360–77.
202. Zhang Z, Ferraris JD, Irrarrazabal CE, Dmitrieva NI, Park J-H, Burg MB. Ataxia telangiectasia-mutated, a DNA damage-inducible kinase, contributes to high NaCl-induced nuclear localization of transcription factor TonEBP/OREBP. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289(3):F506–11.
203. Irrarrazabal CE, Liu JC, Burg MB, Ferraris JD. ATM, a DNA damage-inducible kinase, contributes to activation by high NaCl of the transcription factor TonEBP/OREBP. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101(23):8809–14.
204. Ferraris JD, Persaud P, Williams CK, Chen Y, Burg MB. cAMP-independent role of PKA in tonicity-induced transactivation of tonicity-responsive enhancer/osmotic response element-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(26):16800–5.
205. Ko BCB. Fyn and p38 Signaling Are Both Required for Maximal Hypertonic Activation of the Osmotic Response Element-binding Protein/Tonicity-responsive Enhancer-binding Protein (OREBP/TonEBP). *J Biol Chem.* 2002;277(48):46085–92.
206. Wang H, Ferraris JD, Klein JD, Sands JM, Burg MB, Zhou X. PKC- α contributes to high NaCl-induced activation of NFAT5 (TonEBP/OREBP) through MAPK ERK1/2. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015;308(2):F140–8.
207. Ferraris JD, Williams CK, Martin BM, Burg MB, García-Pérez A. Cloning, genomic organization, and osmotic response of the aldose reductase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(22):10742–6.
208. Ferraris JD, Williams CK, Ohtaka A, García-Pérez A. Functional consensus for mammalian osmotic response elements. *Am J Physiol.* 1999;276(3 Pt 1):C667–73.
209. Burg MB, Kwon ED, Kültz D. Regulation of gene expression by hypertonicity. *Annu Rev Physiol.* 1997;59:437–55.
210. Garcia-Perez A, Burg MB. Renal medullary organic osmolytes. *Physiol Rev.* 1991;71(4):1081–115.
211. Shioda R, Reinach PS, Hisatsune T, Miyamoto Y. Osmosensitive Taurine Transporter Expression and Activity in Human Corneal Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(9):2916–22.

212. Yokoyama T, Lin LR, Chakrapani B, Reddy VN. Hypertonic stress increases NaK ATPase, taurine, and myoinositol in human lens and retinal pigment epithelial cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34(8):2512–7.
213. El-Sherbeny A, Naggar H, Miyachi S, Ola MS, Maddox DM, Martin PM, et al. Osmoregulation of Taurine Transporter Function and Expression in Retinal Pigment Epithelial, Ganglion, and Muller Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(2):694–701.
214. Satsu H, Miyamoto Y, Shimizu M. Hypertonicity stimulates taurine uptake and transporter gene expression in Caco-2 cells. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1419(1):89–96.
215. Woo SK, Lee S Do, Kwon HM. TonEBP transcriptional activator in the cellular response to increased osmolality. *Pflugers Arch.* 2002;444(5):579–85.
216. Kwon HM, Handler JS. Cell volume regulated transporters of compatible osmolytes. *Curr Opin Cell Biol.* 1995;7(4):465–71.
217. Miyakawa H, Woo SK, Chen CP, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Cis- and trans-acting factors regulating transcription of the BGT1 gene in response to hypertonicity. *Am J Physiol.* 1998;274(4 Pt 2):F753–61.
218. Ito T, Fujio Y, Hirata M, Takatani T, Matsuda T, Muraoka S, et al. Expression of taurine transporter is regulated through the TonE (tonicity-responsive element)/TonEBP (TonE-binding protein) pathway and contributes to cytoprotection in HepG2 cells. *Biochem J.* 2004;382(Pt 1):177–82.
219. Woo SK, Lee S Do, Na KY, Park WK, Kwon HM. TonEBP/NFAT5 stimulates transcription of HSP70 in response to hypertonicity. *Mol Cell Biol.* 2002;22(16):5753–60.
220. Shim E-H, Kim J-I, Bang E-S, Heo J-S, Lee J-S, Kim E-Y, et al. Targeted disruption of hsp70.1 sensitizes to osmotic stress. *EMBO Rep.* 2002 Sep;3(9):857–61.
221. Lee JH, Kim M, Im YS, Choi W, Byeon SH, Lee HK. NFAT5 induction and its role in hyperosmolar stressed human limbal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(5):1827–35.
222. Clouzeau C, Godefroy D, Riancho L, Rostène W, Baudouin C, Brignole-Baudouin F. Hyperosmolarity potentiates toxic effects of benzalkonium chloride on conjunctival epithelial cells in vitro. *Mol Vis.* 2012;18:851–63.
223. Michea L, Ferguson DR, Peters EM, Andrews PM, Kirby MR, Burg MB. Cell cycle delay and apoptosis are induced by high salt and urea in renal medullary cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Feb;278(2):F209–18.
224. Bortner CD, Cidlowski JA. Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes. *Am J Physiol.* 1996;271(3 Pt 1):950–61.
225. Galvez A, Morales MP, Eltit JM, Ocaranza P, Carrasco L, Campos X, et al. A rapid and strong apoptotic process is triggered by hyperosmotic stress in cultured rat cardiac myocytes. *Cell Tissue Res.* 2001;304(2):279–85.
226. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239–57.
227. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980;68:251–306.
228. Schwartz L, Guais A, Pooya M, Abolhassani M. Is inflammation a consequence of extracellular hyperosmolarity? *J Inflamm (Lond).* 2009;6(1):21.
229. Abolhassani M, Wertz X, Pooya M, Chaumet-Riffaud P, Guais A, Schwartz L. Hyperosmolarity causes inflammation through the methylation of protein phosphatase 2A. *Inflamm Res.* 2008;57(9):419–29.
230. Shapiro L, Dinarello CA. Hyperosmotic Stress as a Stimulant for Proinflammatory Cytokine Production. *Exp Cell Res.* 1997;231(2):354–62.
231. Lang KS, Fillon S, Schneider D, Rammensee H-G, Lang F. Stimulation of TNF alpha expression by hyperosmotic stress. *Pflugers Arch.* 2002 Mar;443(5-6):798–803.
232. Asakawa H, Miyagawa J, Hanafusa T, Kuwajima M, Matsuzawa Y. High glucose and hyperosmolarity increase secretion of interleukin-1 beta in cultured human aortic endothelial cells. *J Diabetes Complications.* 1997;11(3):176–9.
233. Shapiro L, Dinarello CA. Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(26):12230–4.
234. Furuichi S, Hashimoto S, Gon Y, Matsumoto K, Horie T. p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase regulate interleukin-8 and RANTES production in hyperosmolarity stimulated human bronchial epithelial cells. *Respirology.* 2002;7(3):193–200.

235. Li D, Luo L, Chen Z, Kim H-S, Song XJ, Pflugfelder SC. JNK and ERK MAP kinases mediate induction of IL-1 β , TNF- α and IL-8 following hyperosmolar stress in human limbal epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2006;82(4):588–96.
236. Németh ZH, Deitch E a, Szabó C, Haskó G. Hyperosmotic stress induces nuclear factor-kappaB activation and interleukin-8 production in human intestinal epithelial cells. *Am J Pathol.* 2002;161(3):987–96.
237. Hashimoto S, Matsumoto K, Gon Y, Nakayama T, Takeshita I, Horie T. Hyperosmolarity-induced interleukin-8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159(2):634–40.
238. Brocker C, Thompson DC, Vasiliou V. The role of hyperosmotic stress in inflammation and disease. *Biomol Concepts.* 2012;3(4):345–64.
239. Neuhofer W. Role of NFAT5 in inflammatory disorders associated with osmotic stress. *Curr Genomics.* 2010;11(8):584–90.
240. Stevenson W, Chauhan S, Dana R. Dry eye disease: an immune-mediated ocular surface disorder. *Arch Ophthalmol.* 2012;130(1):90–100.
241. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:463–516.
242. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* [Internet]. 2000;18(5):1135–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10694567>
243. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interf cytokine Res.* 2009;29(6):313–26.
244. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(13):5134–8.
245. Standiford TJ, Kunkel SL, Phan SH, Rollins BJ, Strieter RM. Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J Biol Chem.* 1991;266(15):9912–8.
246. Brown Z, Strieter RM, Neild GH, Thompson RC, Kunkel SL, Westwick J. IL-1 receptor antagonist inhibits monocyte chemotactic peptide 1 generation by human mesangial cells. *Kidney Int.* 1992;42(1):95–101.
247. Mancilla-Herrera I, Alvarado-Moreno JA, Cébulo-Vázquez A, Prieto-Chávez JL, Ferat-Osorio E, López-Macías C, et al. Activated endothelial cells limit inflammatory response, but increase chemoattractant potential and bacterial clearance by human monocytes. *Cell Biol Int.* 2015 Jun;39(6):721–32.
248. Hua X, Su Z, Deng R, Lin J, Li D-Q, Pflugfelder SC. Effects of L-Carnitine, Erythritol and Betaine on Pro-inflammatory Markers in Primary Human Corneal Epithelial Cells Exposed to Hyperosmotic Stress. *Curr Eye Res.* 2015;40(7):657–67.
249. Küper C, Beck F-X, Neuhofer W. NFAT5 contributes to osmolality-induced MCP-1 expression in mesothelial cells. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:513015.
250. Cavet ME, Harrington KL, Vollmer TR, Ward KW, Zhang J-Z. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of the green tea polyphenol epigallocatechin gallate in human corneal epithelial cells. *Mol Vis.* 2011;17:533–42.
251. Cavet ME, Harrington KL, Ward KW, Zhang J-Z. Mapracorat, a novel selective glucocorticoid receptor agonist, inhibits hyperosmolar-induced cytokine release and MAPK pathways in human corneal epithelial cells. *Mol Vis.* 2010;16:1791–800.
252. Bartoli C, Civatte M, Pellissier JF, Figarella-Branger D. CCR2A and CCR2B, the two isoforms of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor are up-regulated and expressed by different cell subsets in idiopathic inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol.* 2001;102(4):385–92.
253. Hayashida K, Nanki T, Girschick H, Yavuz S, Ochi T, Lipsky PE. Synovial stromal cells from rheumatoid arthritis patients attract monocytes by producing MCP-1 and IL-8. *Arthritis Res.* 2001;3(2):118–26.
254. Sørensen TL, Ransohoff RM, Strieter RM, Sellebjerg F. Chemokine CCL2 and chemokine receptor CCR2 in early active multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2004;11(7):445–9.
255. Kusano KF, Nakamura K, Kusano H, Nishii N, Banba K, Ikeda T, et al. Significance of the level of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerosis. *Circ J.* 2004;68(7):671–6.

256. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112(5):1557–69.
257. Pflugfelder SC, Corrales RM, de Paiva CS. T helper cytokines in dry eye disease. *Exp Eye Res*. 2013;117:118–25.
258. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets : Th1 , Th2 and more. *Immunol Today*. 1996;
259. Campbell JD, HayGlass KT. T cell chemokine receptor expression in human Th1- and Th2-associated diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2000;48(6):451–6.
260. Chen Z, O’Shea JJ. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol Res*. 2008;41(2):87–102.
261. Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol*. 2007;19(6):362–71.
262. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(6):652–7.
263. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(7):523–32.
264. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012 Jan;28:137–61.
265. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature*. 2012;481(7381):278–86.
266. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(2):99–109.
267. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(2):89–102.
268. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(1):49–62.
269. Bauernfeind F, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, Speert D, Fernandes-alnemri T, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*. 2009;183(2):787–91.
270. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O’Rourke K, Roose-Girma M, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*. 2006;440(7081):228–32.
271. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 2006;440(7081):237–41.
272. Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ*. 2007;14(9):1583–9.
273. Guo H, Callaway JB, Ting JP-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med* [Internet]. 2015;21(7):677–87. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nm.3893>
274. Ozaki E, Campbell M, Doyle S. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives. *J Inflamm Res*. 2015;8:15–27.
275. Fullard RJ, Snyder C. Protein levels in nonstimulated and stimulated tears of normal human subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1990;31(6):1119–26.
276. López-Cisternas J, Castillo-Díaz J, Traipe-Castro L, López-Solís RO. Use of polyurethane minisponges to collect human tear fluid. *Cornea*. 2006;25(3):312–8.
277. VanDerMeid KR, Su SP, Krenzer KL, Ward KW, Zhang J-Z. A method to extract cytokines and matrix metalloproteinases from Schirmer strips and analyze using Luminex. *Mol Vis*. 2011;17:1056–63.
278. Inic-Kanada A, Nussbaumer A, Montanaro J, Belij S, Schlacher S, Stein E, et al. Comparison of ophthalmic sponges and extraction buffers for quantifying cytokine profiles in tears using Luminex technology. *Mol Vis*. 2012;18:2717–25.
279. Bjerrum KB, Prause JU. Collection and concentration of tear proteins studied by SDS gel electrophoresis. Presentation of a new method with special reference to dry eye patients. *Graefe’s Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1994;32(7):402–5.
280. Guyette N, Williams L, Tran M-T, Than T, Bradley J, Kehinde L, et al. Comparison of low-abundance biomarker levels in capillary-collected nonstimulated tears and washout tears of aqueous-deficient and normal patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(5):3729–37.

281. Brignole-Baudouin F, Ott A-C, Warnet J-M, Baudouin C. Flow cytometry in conjunctival impression cytology: a new tool for exploring ocular surface pathologies. *Exp Eye Res.* 2004;78(3):473–81.
282. Yağmur M, Ersöz C, Ersöz TR, Varinli S. Brush technique in ocular surface cytology. *Diagn Cytopathol.* 1997;17(2):88–91.
283. Pepose JS, Akata RF, Pflugfelder SC, Voigt W. Mononuclear cell phenotypes and immunoglobulin gene rearrangements in lacrimal gland biopsies from patients with Sjögren's syndrome. *Ophthalmology.* 1990;97(12):1599–605.
284. Saito I, Terauchi K, Shimuta M, Nishiimura S, Yoshino K, Takeuchi T, et al. Expression of cell adhesion molecules in the salivary and lacrimal glands of Sjogren's syndrome. *J Clin Lab Anal.* 1993;7(3):180–7.
285. Hong J, Zhu W, Zhuang H, Xu J, Sun X, Le Q, et al. In vivo confocal microscopy of conjunctival goblet cells in patients with Sjogren's syndrome dry eye. *Br J Ophthalmol.* 2010;94(11):1454–8.
286. Yoon K-C, Jeong I-Y, Park Y-G, Yang S-Y. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in tears of patients with dry eye syndrome. *Cornea.* 2007;26(4):431–7.
287. Lam H, Bleiden L, De Paiva CS, William F, E SM, Pflugfelder SC. Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome. *Am J Ophthalmol.* 2009;147(2):1–19.
288. Boehm N, Riechardt AI, Wiegand M, Pfeiffer N, Grus FH. Proinflammatory cytokine profiling of tears from dry eye patients by means of antibody microarrays. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(10):7725–30.
289. Na K-S, Mok J-W, Kim JY, Rho CR, Joo C-K. Correlations between tear cytokines, chemokines, and soluble receptors and clinical severity of dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(9):5443–50.
290. Lee SY, Han SJ, Nam SM, Yoon SC, Ahn JM, Kim T-I, et al. Analysis of tear cytokines and clinical correlations in Sjögren syndrome dry eye patients and non-Sjögren syndrome dry eye patients. *Am J Ophthalmol.* 2013;156(2):247–53.e1.
291. Massingale ML, Li X, Vallabhajosyula M, Chen D, Wei Y, Asbell P a. Analysis of inflammatory cytokines in the tears of dry eye patients. *Cornea.* 2009;28(9):1023–7.
292. Choi W, Li Z, Oh H-J, Im S-K, Lee S-H, Park S-H, et al. Expression of CCR5 and its ligands CCL3, -4, and -5 in the tear film and ocular surface of patients with dry eye disease. *Curr Eye Res.* 2012;37(1):12–7.
293. Tishler M, Yaron I, Geyer O, Shirazi I, Naftaliev E, Yaron M. Elevated Tear Interleukin-6 Levels in Patients with Sjogren Syndrome. *Ophthalmology.* 1998;105(12):2327–9.
294. Solomon A, Dursun D, Liu Z, Xie Y, Macri A, Pflugfelder SC. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(10):2283–92.
295. Jones DT, Monroy D, Ji Z, Atherton SS, Pflugfelder SC. Sjogren's Syndrome : Cytokine and Epstein-Barr Viral Gene Expression Within the Conjunctival Epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;35(9):3493–504.
296. Jones DT, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC. Alterations of ocular surface gene expression in Sjögren's syndrome. *Adv Exp Med Biol.* 1998;438:533–6.
297. Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, Afonso A, Monroy D. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res.* 1999;19(3):201–11.
298. Kawasaki S, Kawamoto S, Yokoi N, Connon C, Minesaki Y, Kinoshita S, et al. Up-regulated gene expression in the conjunctival epithelium of patients with Sjögren's syndrome. *Exp Eye Res.* 2003;77(1):17–26.
299. Zheng Q, Ren Y, Reinach PS, Xiao B, Lu H, Zhu Y, et al. Reactive oxygen species activated NLRP3 inflammasomes initiate inflammation in hyperosmolarity stressed human corneal epithelial cells and environment-induced dry eye patients. *Exp Eye Res.* 2015;134:133–40.
300. Niu L, Zhang S, Wu J, Chen L, Wang Y. Upregulation of NLRP3 Inflammasome in the Tears and Ocular Surface of Dry Eye Patients. *PLoS One.* 2015;10(5):e0126277.
301. Yoon K-C, Park C-S, You I-C, Choi H-J, Lee K-H, Im S-K, et al. Expression of CXCL9, -10, -11, and CXCR3 in the Tear Film and Ocular Surface of Patients with Dry Eye Syndrome. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2010;51(2):643.
302. Enríquez-de-Salamanca A, Castellanos E, Stern ME, Fernández I, Carreño E, García-Vázquez C, et al. Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol Vis.* 2010;16:862–73.
303. Gulati A, Sacchetti M, Bonini S, Dana R. Chemokine Receptor CCR5 Expression in Conjunctival Epithelium of Patients With Dry Eye Syndrome. *Arch Ophthalmol.* 2006;124(5):710.

304. Baudouin C, Liang H, Bremond-Gignac D, Hamard P, Hreicche R, Creuzot-Garcher C, et al. 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.* 2005;116(3):614–9.
305. Tan X, Sun S, Liu Y, Zhu T, Wang K, Ren T, et al. Analysis of Th17-associated cytokines in tears of patients with dry eye syndrome. *Eye.* 2014;28(5):608–13.
306. Zheng X, De Paiva CS, Rao K, Li D-Q, Farley WJ, Stern M, et al. Evaluation of the Transforming Growth Factor- β Activity in Normal and Dry Eye Human Tears by CCL-185 Cell Bioassay. *Cornea.* 2010;29(9):1048–54.
307. Stern ME, Gao J, Schwalb TA, Ngo M, Tieu DD, Chan C, et al. Conjunctival T-Cell Subpopulations in Sjogren’s and Non-Sjogren’s Patients with Dry Eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(8):2609–14.
308. Tsubota K, Fujihara T, Saito K, Takeuchi T. Conjunctival epithelium expression of HLA-DR in dry eye patients. *Ophthalmologica.* 1999;213(1):16–9.
309. Chotikavanich S, De Paiva CS, Li DQ, Chen JJ, Bian F, Farley WJ, et al. Production and activity of matrix metalloproteinase-9 on the ocular surface increase in dysfunctional tear syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(7):3203–9.
310. Acera A, Rocha G, Vecino E, Lema I, Durán JA. Inflammatory Markers in the Tears of Patients with Ocular Surface Disease. *Ophthalmic Res.* 2008;40(6):315–21.
311. Huet E, Vallée B, Delbé J, Mourah S, Prulière-Escabasse V, Tremouilleres M, et al. EMMPRIN modulates epithelial barrier function through a MMP-mediated occludin cleavage: implications in dry eye disease. *Am J Pathol.* 2011;179(3):1278–86.
312. Rolando M, Barabino S, Mingari C, Moretti S, Giuffrida S, Calabria G. Distribution of conjunctival HLA-DR expression and the pathogenesis of damage in early dry eyes. *Cornea.* 2005;24(8):951–4.
313. Yannopoulos DI, Roncin S, Lamour A, Pennec YL, Moutsopoulos HM, Youinou P. Conjunctival epithelial cells from patients with Sjögren’s syndrome inappropriately express major histocompatibility complex molecules, La(SSB) antigen, and heat-shock proteins. *J Clin Immunol.* 1992;12(4):259–65.
314. Raphael M, Bellefqih S, Piette JC, Le Hoang P, Debre P, Chomette G. Conjunctival biopsy in Sjögren’s syndrome: correlations between histological and immunohistochemical features. *Histopathology.* 1988;13(2):191–202.
315. Pflugfelder SC, Huang AJ, Feuer W, Chuchovski PT, Pereira IC, Tseng SC. Conjunctival cytologic features of primary Sjögren’s syndrome. *Ophthalmology.* 1990;97(8):985–91.
316. Narayanan S, Miller WL, McDermott AM. Conjunctival cytokine expression in symptomatic moderate dry eye subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(6):2445–50.
317. Danjo Y, Watanabe H, Tisdale AS, George M, Tsumura T, Abelson MB, et al. Alteration of mucin in human conjunctival epithelia in dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(13):2602–9.
318. Caffery B, Heynen ML, Joyce E, Jones L, Ritter R, Senchyna M. MUC1 expression in Sjogren’s syndrome, KCS, and control subjects. *Mol Vis.* 2010;16:1720–7.
319. Caffery B, Joyce E, Heynen ML, Jones L, Ritter R, Gamache DA, et al. MUC16 expression in Sjogren’s syndrome, KCS, and control subjects. *Mol Vis.* 2008;14:2547–55.
320. Argüeso P, Balaram M, Spurr-Michaud S, Keutmann HT, Dana MR, Gipson IK. Decreased levels of the goblet cell mucin MUC5AC in tears of patients with Sjögren syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(4):1004–11.
321. Abdel-Khalek LM, Williamson J, Lee WR. Morphological changes in the human conjunctival epithelium. II. In keratoconjunctivitis sicca. *Br J Ophthalmol.* 1978;62(11):800–6.
322. Ralph RA. Conjunctival goblet cell density in normal subjects and in dry eye syndromes. *Invest Ophthalmol.* 1975;14(4):299–302.
323. Augustin AJ, Spitznas M, Kaviani N, Meller D, Koch FH, Grus F, et al. Oxidative reactions in the tear fluid of patients suffering from dry eyes. *Graefe’s Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1995;233(11):694–8.
324. Murube J, Rivas L. Impression cytology on conjunctiva and cornea in dry eye patients establishes a correlation between squamous metaplasia and dry eye clinical severity. *Eur J Ophthalmol.* 2003 Mar;13(2):115–27.
325. Murube J, Rivas L. Biopsy of the conjunctiva in dry eye patients establishes a correlation between squamous metaplasia and dry eye clinical severity. *Eur J Ophthalmol.* 2003;13(3):246–56.

326. Rivas L, Oroza MA, Perez-Esteban A, Murube-del-Castillo J. Morphological changes in ocular surface in dry eyes and other disorders by impression cytology. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1992;230(4):329–34.
327. Barabino S, Dana MR. Animal models of dry eye: a critical assessment of opportunities and limitations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(6):1641–6.
328. Burgalassi S, Panichi L, Chetoni P, Saettone MF, Boldrini E. Development of a simple dry eye model in the albino rabbit and evaluation of some tear substitutes. *Ophthalmic Res*. 1999;31(3):229–35.
329. Shafiee A, Bucolo C, Budzynski E, Ward KW, López FJ. In vivo ocular efficacy profile of mapracorat, a novel selective glucocorticoid receptor agonist, in rabbit models of ocular disease. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(3):1422–30.
330. El-Shazly AHM, El-Gohary AA, El-Shazly LHM, El-Hossary GG. Comparison between two cyclooxygenase inhibitors in an experimental dry eye model in albino rabbits. *Acta Pharm*. 2008;58(2):163–73.
331. Dursun D, Wang M, Monroy D, Li D-Q, Lokeshwar BL, Stern ME, et al. A mouse model of keratoconjunctivitis sicca. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(3):632–8.
332. Chen W, Zhao K, Li X, Yoshitomi T. Keratoconjunctivitis sicca modifies epithelial stem cell proliferation kinetics in conjunctiva. *Cornea*. 2007;26(9):1101–6.
333. Chen Y, Chauhan SK, Lee HS, Stevenson W, Schaumburg CS, Sadrai Z, et al. Effect of desiccating environmental stress versus systemic muscarinic AChR blockade on dry eye immunopathogenesis. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(4):2457–64.
334. Viau S, Maire MA, Pasquis B, Grégoire S, Fourceux C, Acar N, et al. Time course of ocular surface and lacrimal gland changes in a new scopolamine-induced dry eye model. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008;246(6):857–67.
335. Suwan-apichon O, Rizen M, Rangsin R, Herretes S, Reyes JMG, Lekhanont K, et al. Botulinum toxin B-induced mouse model of keratoconjunctivitis sicca. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(1):133–9.
336. Gilbard JP, Rossi SR, Gray KL, Hanninen L a. Natural history of disease in a rabbit model for keratoconjunctivitis sicca. *Acta Ophthalmol Suppl (Oxf)*. 1989;192:95–101.
337. Gilbard JP, Rossi SR, Gray KL. A new rabbit model for keratoconjunctivitis sicca. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1987;28(2):225–8.
338. Gilbard JP, Rossi SR, Heyda KG. Tear film and ocular surface changes after closure of the meibomian gland orifices in the rabbit. *Ophthalmology*. 1989;96(8):1180–6.
339. Gilbard JP, Rossi SR, Gray KL, Hanninen L a., Kenyon KR. Tear film osmolarity and ocular surface disease in two rabbit models for keratoconjunctivitis sicca. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1988;29(3):374–8.
340. Fujihara T, Murakami T, Fujita H, Nakamura M, Nakata K. Improvement of corneal barrier function by the P2Y(2) agonist INS365 in a rat dry eye model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(1):96–100.
341. Dota A, Takaoka-Shichijo Y, Nakamura M. Gefarnate stimulates mucin-like glycoprotein secretion in conjunctival tissue and ameliorates corneal epithelial damage in animal dry-eye models. *Clin Ophthalmol*. 2013;7:211–7.
342. Li N, Deng X, Gao Y, Zhang S, He M, Zhao D. Establishment of the mild, moderate and severe dry eye models using three methods in rabbits. *BMC Ophthalmol*. 2013;13:50.
343. Odaka A, Toshida H, Ohta T, Tabuchi N, Koike D, Suto C, et al. Efficacy of retinol palmitate eye drops for dry eye in rabbits with lacrimal gland resection. *Clin Ophthalmol*. 2012;6(1):1585–93.
344. Qin Y, Tan X, Zhang Y, Jie Y, Labbe A, Pan Z. A new nonhuman primate model of severe dry eye. *Cornea*. 2014;33(5):510–7.
345. Gilbard JP, Rossi SR. Tear film and ocular surface changes in a rabbit model of neurotrophic keratitis. *Ophthalmology*. 1990;97(3):308–12.
346. Toshida H, Nguyen D, Beuerman R, Murakami A. Evaluation of novel dry eye : preganglionic parasympathetic denervation in rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(10):997–1003.
347. Toshida H, Nguyen DH, Beuerman RW, Murakami A. Neurologic evaluation of acute lacrimomimetic effect of cyclosporine in an experimental rabbit dry eye mode. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(6):2736–41.
348. Ferrari G, Chauhan SK, Ueno H, Nallasamy N, Gandolfi S, Borges L, et al. A novel mouse model for neurotrophic keratopathy: Trigeminal nerve stereotactic electrolysis through the brain. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(5):2532–9.

349. Ferrari G, Ueno H, Bignami F, Rama P, Dana R. Trigeminal stereotactic electrolysis induces dry eye in mice. *Acta Ophthalmol.* 2013;91(2):162–3.
350. Song XJ, Li D-Q, Farley W, Luo LH, Heuckeroth RO, Milbrandt J, et al. Neurturin-deficient mice develop dry eye and keratoconjunctivitis sicca. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Oct;44(10):4223–9.
351. Barabino S, Shen L, Chen L, Rashid S, Rolando M, Dana MR. The controlled-environment chamber: a new mouse model of dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(8):2766–71.
352. Chen W, Zhang X, Zhang J, Chen J, Wang S, Wang Q, et al. A murine model of dry eye induced by an intelligently controlled environmental system. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(4):1386–91.
353. Henriksson JT, De Paiva C, Farley W, Pflugfelder S, Burns A, Bergmanson J. Morphologic alterations of the palpebral conjunctival epithelium in a dry eye model. *Cornea.* 2013;32(4):483–90.
354. Yeh S, Song XJ, Farley W, Li DQ, Stern ME, Pflugfelder SC. Apoptosis of ocular surface cells in experimentally induced dry eye. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(1):124–9.
355. Zheng Q, Ren Y, Reinach PS, She Y, Xiao B, Hua S, et al. Reactive oxygen species activated NLRP3 inflammasomes prime environment-induced murine dry eye. *Exp Eye Res.* 2014;125:1–8.
356. Fabiani C, Barabino S, Rashid S, Dana MR. Corneal epithelial proliferation and thickness in a mouse model of dry eye. *Exp Eye Res.* 2009;89(2):166–71.
357. Suhaimi J, Parfitt G, Xie Y, de Paiva CS, Pflugfelder SC, Shah T, et al. Effect of desiccating stress on mouse meibomian gland function. *Ocul Surf.* 2014;12(1):59–68.
358. Nakamura S, Shibuya M, Nakashima H, Imagawa T, Uehara M, Tsubota K. D-beta-hydroxybutyrate protects against corneal epithelial disorders in a rat dry eye model with jogging board. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(7):2379–87.
359. Nakamura S, Shibuya M, Nakashima H, Hisamura R, Masuda N, Imagawa T, et al. Involvement of oxidative stress on corneal epithelial alterations in a blink-suppressed dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(4):1552–8.
360. Fujihara T, Murakami T, Nagano T, Nakamura M, Nakata K. INS365 suppresses epithelial integrity loss of cornea by secretion of mucin-like glycoprotein in a rabbit short-term dry eye model. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2002;18(4):363–70.
361. Higuchi A, Kawakita T, Tsubota K. IL-6 induction in desiccated corneal epithelium in vitro and in vivo. *Mol Vis.* 2011;17:2400–6.
362. Fujihara T, Nagano T, Nakamura M, Shirasawa E. Establishment of a rabbit short-term dry eye model. *J Ocul Pharmacol Ther.* 1995;11(4):503–8.
363. Beyazyıldız E, Pınarlı FA, Beyazyıldız O, Hekimoğlu ER, Acar U, Demir MN, et al. Efficacy of topical mesenchymal stem cell therapy in the treatment of experimental dry eye syndrome model. *Stem Cells Int.* 2014 Jan;2014.
364. Li C, Song Y, Luan S, Wan P, Li N, Tang J, et al. Research on the stability of a rabbit dry eye model induced by topical application of the preservative benzalkonium chloride. *PLoS One.* 2012;7(3):1–9.
365. Lin Z, Zhou Y, Wang Y, Zhou T, Li J, Luo P, et al. Serine protease inhibitor A3K suppressed the formation of ocular surface squamous metaplasia in a mouse model of experimental dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(9):5813–20.
366. Lin Z, Liu X, Zhou T, Wang Y, Bai L, He H, et al. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride. *Mol Vis.* 2011;17:257–64.
367. Xie HP, Zhang HC. Effects of three kinds of topical eye-drops on the experimental rabbit dry eye. *Chin Med J (Engl).* 1993;106(3):196–201.
368. Cai R, Wang Y, Xu J, Zhang C. The effects of hyperosmotic stress on rabbit ocular surface and mucin 5AC expression. *Zhonghua yan ke za zhi - Chinese J Ophthalmol.* 2011;47(3):252–9.
369. Huo J, Xie H, Li J, Zhou D. A primary study of L-carnitine protective effect on corneal and conjunctival epithelium of mouse dry eye model induced by hyperosmolar saline. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 2012;48(4):330–6.
370. Katsuyama I, Arakawa T. A convenient rabbit model of ocular epithelium damage induced by osmotic dehydration. *J Ocul Pharmacol Ther* [Internet]. 2003;19(3):281–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12828846>

371. Nishiyama T, Mishima K, Obara K, Inoue H, Doi T, Kondo S, et al. Amelioration of lacrimal gland inflammation by oral administration of K-13182 in Sjögren's syndrome model mice. *Clin Exp Immunol.* 2007;149(3):586–95.
372. Schenke-Layland K, Xie J, Angelis E, Starcher B, Wu K, Riemann I, et al. Increased degradation of extracellular matrix structures of lacrimal glands implicated in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Matrix Biol.* 2008;27(1):53–66.
373. Oh N, Kim C, Yang J. Effects of Quercetin in a Mouse Model of Experimental Dry Eye. *Cornea.* 2015;34(9):1130–6.
374. Vijmasi T, Chen FYT, Chen YT, Gallup M, McNamara N. Topical administration of interleukin-1 receptor antagonist as a therapy for aqueous-deficient dry eye in autoimmune disease. *Mol Vis.* 2013;19:1957–65.
375. Chen Y-T, Nikulina K, Lazarev S, Bahrami AF, Noble LB, Gallup M, et al. Interleukin-1 as a phenotypic immunomodulator in keratinizing squamous metaplasia of the ocular surface in Sjögren's syndrome. *Am J Pathol.* 2010;177(3):1333–43.
376. Turpie B, Yoshimura T, Gulati A, Rios JD, Dartt DA, Masli S. Sjögren's syndrome-like ocular surface disease in thrombospondin-1 deficient mice. *Am J Pathol.* 2009;175(3):1136–47.
377. Contreras-Ruiz L, Regenfuss B, Mir FA, Kearns J, Masli S. Conjunctival inflammation in thrombospondin-1 deficient mouse model of Sjögren's syndrome. *PLoS One.* 2013 Jan;8(9):e75937.
378. Peng B, Ling J, Lee AJ, Wang Z, Chang Z, Jin W, et al. Defective feedback regulation of NF-kappaB underlies Sjogren's syndrome in mice with mutated kappaB enhancers of the IkappaBalpha promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(34):15193–8.
379. Ueta M, Hamuro J, Yamamoto M, Kaseda K, Akira S, Kinoshita S. Spontaneous Ocular Surface Inflammation and Goblet Cell Disappearance in Ikbz Gene-Disrupted Mice. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2005;46(2):579.
380. Rahimy E, Pitcher JD, Pangelinan SB, Chen W, Farley WJ, Niederkorn JY, et al. Spontaneous autoimmune dacryoadenitis in aged CD25KO mice. *Am J Pathol.* 2010;177(2):744–53.
381. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature.* 1992;359(6397):693–9.
382. Gao J, Schwalb TA, Addeo J V, Ghosn CR, Stern ME. The role of apoptosis in the pathogenesis of canine keratoconjunctivitis sicca: the effect of topical Cyclosporin A therapy. *Cornea.* 1998;17(6):654–63.
383. Uchino Y, Kawakita T, Ishii T, Ishii N, Tsubota K. A new mouse model of dry eye disease : oxidative stress affects functional decline in the lacriaml gland. *Cornea.* 2012;31(Suppl 1):S63–7.
384. Kojima T, Dogru M, Ibrahim OM, Nagata T, Higa K, Shimizu T, et al. The effects of 3% diquafosol sodium application on the tear functions and ocular surface of the Cu,Zn-superoxide dismutase-1 (Sod1)-knockout mice. *Mol Vis.* 2014;20:929–38.
385. Narayanan S, Corrales RM, Farley W, McDermott AM, Pflugfelder SC. Interleukin-1 receptor-1-deficient mice show attenuated production of ocular surface inflammatory cytokines in experimental dry eye. *Cornea.* 2008;27(7):811–7.
386. Chen Y-T, Lazarev S, Bahrami AF, Noble LB, Chen FYT, Zhou D, et al. Interleukin-1 receptor mediates the interplay between CD4+ T cells and ocular resident cells to promote keratinizing squamous metaplasia in Sjögren's syndrome. *Lab Invest.* 2012;92(4):556–70.
387. Okanobo A, Chauhan SK, Dastjerdi MH, Kodati S, Dana R. Efficacy of topical blockade of interleukin-1 in experimental dry eye disease. *Am J Ophthalmol.* 2012;154(1):63–71.
388. You I-C, Coursey TG, Bian F, Barbosa FL, de Paiva CS, Pflugfelder SC. Macrophage Phenotype in the Ocular Surface of Experimental Murine Dry Eye Disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2015 Aug;63(4):299–304.
389. Pflugfelder SC, Farley W, Luo L, Chen LZ, de Paiva CS, Olmos LC, et al. Matrix Metalloproteinase-9 Knockout Confers Resistance to Corneal Epithelial Barrier Disruption in Experimental Dry Eye. *Am J Pathol.* 2005;166(1):61–71.
390. Aluri HS, Kublin CL, Thotakura S, Armaos H, Samizadeh M, Hawley D, et al. Role of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Lacrimal Gland Disease in Animal Models of Sjögren's Syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(9):5218–28.
391. Rashid S, Jin Y, Ecoiffier T, Barabino S, Schaumberg D a, Dana MR. Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye. *Arch Ophthalmol.* 2008;126(2):219–25.
392. Zhu L, Shen J, Zhang C, Park CY, Kohanim S, Yew M, et al. Inflammatory cytokine expression on the ocular surface in the Botulium toxin B induced murine dry eye model. *Mol Vis.* 2009;15:250–8.

393. Zhu L, Zhang C, Chuck RS. Topical steroid and non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit inflammatory cytokine expression on the ocular surface in the botulinum toxin B-induced murine dry eye model. *Mol Vis*. 2012;18:1803–12.
394. Nagelhout TJ, Gamache DA, Roberts L, Brady MT, Yanni JM. Preservation of tear film integrity and inhibition of corneal injury by dexamethasone in a rabbit model of lacrimal gland inflammation-induced dry eye. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2005;21(2):139–48.
395. Seo MJ, Kim JM, Lee MJ, Sohn YS, Kang KK, Yoo M. The therapeutic effect of DA-6034 on ocular inflammation via suppression of MMP-9 and inflammatory cytokines and activation of the MAPK signaling pathway in an experimental dry eye model. *Curr Eye Res*. 2010 Feb;35(2):165–75.
396. Lee MJ, Kim DH, Ryu JS, Ko AY, Ko JH, Kim MK, et al. Topical TSG-6 Administration Protects the Ocular Surface in Two Mouse Models of Inflammation-Related Dry Eye. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2015;56(9):5175.
397. Xiao B, Wang Y, Reinach PS, Ren Y, Li J, Hua S, et al. Dynamic Ocular Surface and Lacrimal Gland Changes Induced in Experimental Murine Dry Eye. *PLoS One*. 2015;10(1):e0115333.
398. Lin B -w., Chen M -z., Fan S -x., Chuck RS, Zhou S -y. Effect of 0.025% FK-506 Eyedrops on Botulinum Toxin B-Induced Mouse Dry Eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;56(1):45–53.
399. Park CY, Zhuang W, Lekhanont K, Zhang C, Cano M, Lee W-S, et al. Lacrimal gland inflammatory cytokine gene expression in the botulinum toxin B-induced murine dry eye model. *Mol Vis*. 2007;13:2222–32.
400. Pitcher JD, De Paiva CS, Pelegrino FSA, McClellan AJ, Raince JK, Pangelinan SB, et al. Pharmacological Cholinergic Blockade Stimulates Inflammatory Cytokine Production and Lymphocytic Infiltration in the Mouse Lacrimal Gland. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2011 May;52(6):3221.
401. Stevenson W, Chen Y, Lee S, Lee HS, Hua J, Dohlman T, et al. Extraorbital Lacrimal Gland Excision : A Reproducible Model of Severe Aqueous Tear-Deficient Dry Eye Disease. *Cornea*. 2014;33(12):1336–41.
402. Pelegrino F, Pflugfelder SC, De Paiva CS. Low humidity environmental challenge causes barrier disruption and cornification of the mouse corneal epithelium via a c-jun N-terminal kinase 2 (JNK2) pathway. *Exp Eye Res*. 2012;94(1):150–6.
403. Luo L, Li D-Q, Doshi A, Farley W, Corrales RM, Pflugfelder SC. Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signaling pathways on the ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(12):4293–301.
404. De Paiva CS, Villarreal AL, Corrales RM, Rahman HT, Chang VY, Farley WJ, et al. Dry eye-induced conjunctival epithelial squamous metaplasia is modulated by interferon- γ . *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(6):2553–60.
405. Chauhan SK, El Annan J, Ecoiffier T, Goyal S, Zhang Q, Saban DR, et al. Autoimmunity in dry eye is due to resistance of TH17 to Treg suppression. *J Immunol*. 2009;182(3):1247–52.
406. Zheng X, de Paiva CS, Li DQ, Farley WJ, Pflugfelder SC. Desiccating stress promotion of Th17 differentiation by ocular surface tissues through a dendritic cell-mediated pathway. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(6):3083–91.
407. De Paiva CS, Chotikavanich S, Pangelinan S, Pitcher III J, Fang B, Zheng X, et al. IL-17 disrupts corneal barrier following desiccating stress. *Mucosal Immunol*. 2009;2(3):243–53.
408. Coursey TG, Bohat R, Barbosa FL, Pflugfelder SC, de Paiva CS. Desiccating Stress-Induced Chemokine Expression in the Epithelium Is Dependent on Upregulation of NKG2D/RAE-1 and Release of IFN- γ in Experimental Dry Eye. *J Immunol*. 2014;193(10):5264–72.
409. De Paiva CS, Pangelinan SB, Chang E, Yoon K-C, Farley WJ, Li D-Q, et al. Essential role for c-Jun N-terminal kinase 2 in corneal epithelial response to desiccating stress. *Arch Ophthalmol*. 2009;127(12):1625–31.
410. Corrales RM, Stern ME, De Paiva CS, Welch J, Li D-Q, Pflugfelder SC. Desiccating stress stimulates expression of matrix metalloproteinases by the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(8):3293–302.
411. Annan J El, Chauhan SK, Ecoiffier T, Zhang Q, Daniel R, Dana R. Characterisation of effector T cells in dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(8):3802–7.
412. Chen Y, Chauhan SK, Saban DR, Sadrai Z, Okanobo A, Dana R. Interferon-gamma-secreting NK cells promote induction of dry eye disease. *J Leukoc Biol*. 2011;89(6):965–72.
413. Coursey TG, Gandhi NB, Volpe EA, Pflugfelder SC, de Paiva CS. Chemokine receptors CCR6 and CXCR3 are necessary for CD4(+) T cell mediated ocular surface disease in experimental dry eye disease. *PLoS One*. 2013;8(11):e78508.

414. Xiong C, Chen D, Liu J, Liu B, Li N, Zhou Y, et al. A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(5):1850–6.
415. Luo L, Li D-Q, Corrales RM, Pflugfelder SC. Hyperosmolar saline is a proinflammatory stress on the mouse ocular surface. *Eye Contact Lens.* 2005;31(5):186–93.
416. Gao J, Morgan G, Tieu D, Schwalb T, Luo J, Wheeler L, et al. ICAM-1 expression predisposes ocular tissues to immune-based inflammation in dry eye patients and Sjogrens syndrome-like MRL/lpr mice. *Exp Eye Res.* 2004;78(4):823–35.
417. Xuan J, Shen L, Malyavantham K, Pankewycz O, Ambrus JL, Suresh L. Temporal histological changes in lacrimal and major salivary glands in mouse models of Sjogren’s syndrome. *BMC Oral Health.* 2013 Jan;13:51.
418. Zhou D, Chen YT, Chen F, Gallup M, Vijmasi T, Bahrami AF, et al. Critical involvement of macrophage infiltration in the development of Sjögren’s syndrome-associated dry eye. *Am J Pathol.* 2012;181(3):753–60.
419. Yoon K-C, De Paiva CS, Qi H, Chen Z, Farley WJ, Li D-Q, et al. Desiccating environmental stress exacerbates autoimmune lacrimal keratoconjunctivitis in non-obese diabetic mice. *J Autoimmun.* 2008;30(4):212–21.
420. Zhang X, De Paiva C, Su Z, Volpe E, Li D, Pflugfelder SC. Topical interferon-gamma neutralization prevents conjunctival goblet cell loss in experimental murine dry eye. *Exp Eye Res.* 2014;118:117–24.
421. Zhang X, Chen W, De Paiva CS, Volpe EA, Gandhi NB, Farley WJ, et al. Desiccating stress induces CD4+ T-cell-mediated Sjögren’s syndrome-like corneal epithelial apoptosis via activation of the extrinsic apoptotic pathway by interferon- γ . *Am J Pathol.* 2011;179(4):1807–14.
422. Zhang X, Chen W, De Paiva CS, Corrales RM, Volpe EA, McClellan AJ, et al. Interferon- γ Exacerbates Dry Eye–Induced Apoptosis in Conjunctiva through Dual Apoptotic Pathways. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2011;52(9):6279–85.
423. De Paiva CS, Volpe EA, Gandhi NB, Zhang X, Zheng X, Pitcher JD, et al. Disruption of TGF- β signaling improves ocular surface epithelial disease in experimental autoimmune keratoconjunctivitis sicca. *PLoS One.* 2011;6(12):e29017.
424. Niederkorn JY, Stern ME, Pflugfelder SC, De Paiva CS, Corrales RM, Gao J, et al. Desiccating stress induces T cell-mediated Sjögren’s Syndrome-like lacrimal keratoconjunctivitis. *J Immunol.* 2006;176(7):3950–7.
425. Jabs DA, Prendergast RA, Rorer EM, Hudson AP, Whittum-Hudson JA. Cytokines in autoimmune lacrimal gland disease in MRL/MpJ mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(11):2567–71.
426. Jabs DA, Lee B, Whittum-Hudson JA, Prendergast RA. Th1 versus Th2 immune responses in autoimmune lacrimal gland disease in MRL/Mp mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(3):826–31.
427. Corrales RM, Villarreal A, Farley W, Stern ME, Li D-Q, Pflugfelder SC. Strain-related cytokine profiles on the murine ocular surface in response to desiccating stress. *Cornea.* 2007;26(5):579–84.
428. Yoon KC, De Paiva CS, Qi H, Chen Z, Farley WJ, Li DQ, et al. Expression of Th-1 chemokines and chemokine receptors on the ocular surface of C57BL/6 mice: Effects of desiccating stress. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(6):2561–9.
429. Barabino S, Rolando M, Chen L, Dana MR. Exposure to a dry environment induces strain-specific responses in mice. *Exp Eye Res.* 2007;84(5):973–7.
430. Chen X, Oppenheim JJ, Howard OMZ. BALB/c mice have more CD4+CD25+ T regulatory cells and show greater susceptibility to suppression of their CD4+CD25- responder T cells than C57BL/6 mice. *J Leukoc Biol.* 2005;78(1):114–21.
431. Liu T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Yajima T, Yoshikai Y. Differences in expression of toll-like receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c and C57BL/6 mice. *Infect Immun.* 2002;70(12):6638–45.
432. Gorham JD, Güler ML, Steen RG, Mackey AJ, Daly MJ, Frederick K, et al. Genetic mapping of a murine locus controlling development of T helper 1/T helper 2 type responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(22):12467–72.
433. Müller A, Schott-Ohly P, Dohle C, Gleichmann H. Differential regulation of Th1-type and Th2-type cytokine profiles in pancreatic islets of C57BL/6 and BALB/c mice by multiple low doses of streptozotocin. *Immunobiology.* 2002;205(1):35–50.
434. Palumbo ML, Canzobre MC, Pascuan CG, Ríos H, Wald M, Genaro AM. Stress induced cognitive deficit is differentially modulated in BALB/c and C57BL/6 mice: correlation with Th1/Th2 balance after stress exposure. *J Neuroimmunol.* 2010;218(1-2):12–20.

435. Stewart P, Chen Z, Farley W, Olmos L, Pflugfelder SC. Effect of experimental dry eye on tear sodium concentration in the mouse. *Eye Contact Lens*. 2005;31(4):175–8.
436. Ma X, Zou J, He L, Zhang Y. Dry eye management in a Sjögren's syndrome mouse model by inhibition of p38-MAPK pathway. *Diagn Pathol*. 2014;9:5.
437. Goyal S, Chauhan SK, Zhang Q, Dana R. Amelioration of Murine Dry Eye Disease by Topical Antagonist to Chemokine Receptor 2. *Arch Ophthalmol*. 2009;127(7):882–7.
438. Chen Y, Li M, Li B, Wang W, Lin A, Sheng M. Effect of reactive oxygen species generation in rabbit corneal epithelial cells on inflammatory and apoptotic signaling pathways in the presence of high osmotic pressure. *PLoS One*. 2013;8(8):e72900.
439. Gilbard J, Carter J, Sang D, Refojo M, Hanninen L, Kenyon K. Morphologic effect of hyperosmolarity on rabbit corneal epithelium. *Ophthalmology*. 1984;91(10):1205–12.
440. Luo L, Li D-Q, Pflugfelder SC. Hyperosmolarity-induced apoptosis in human corneal epithelial cells is mediated by cytochrome c and MAPK pathways. *Cornea*. 2007;26(4):452–60.
441. Garrett Q, Khandekar N, Shih S, Flanagan JL, Simmons P, Vehige J, et al. Betaine stabilizes cell volume and protects against apoptosis in human corneal epithelial cells under hyperosmotic stress. *Exp Eye Res*. 2013;108:33–41.
442. Khandekar N, Willcox MDP, Shih S, Simmons P, Vehige J, Garrett Q. Decrease in hyperosmotic stress – induced corneal epithelial cell apoptosis by L-carnitine. *Mol Vis*. 2013;19:1945–56.
443. Png E, Samivelu GK, Yeo SH, Chew J, Chaurasia SS, Tong L. Hyperosmolarity-mediated mitochondrial dysfunction requires Transglutaminase-2 in human corneal epithelial cells. *J Cell Physiol*. 2011;226(3):693–9.
444. Wang L, Dai W, Lu L. Hyperosmotic stress-induced corneal epithelial cell death through activation of Polo-like kinase 3 and c-Jun. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(6):3200–6.
445. Deng R, Hua X, Li J, Chi W, Zhang Z, Lu F, et al. Oxidative stress markers induced by hyperosmolarity in primary human corneal epithelial cells. *PLoS One*. 2015 Jan;10(5):e0126561.
446. Wang C, Shi X, Chen X, Wu H, Zhang H, Xie J, et al. 17- β -estradiol inhibits hyperosmolarity-induced proinflammatory cytokine elevation via the p38 MAPK pathway in human corneal epithelial cells. *Mol Vis*. 2012;18:1115–22.
447. Li D-Q, Chen Z, Song XJ, Luo L, Pflugfelder SC. Stimulation of matrix metalloproteinases by hyperosmolarity via a JNK pathway in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(12):4302–11.
448. Deng R, Su Z, Hua X, Zhang Z, Li D, Pflugfelder SC. Osmoprotectants suppress the production and activity of matrix metalloproteinases induced by hyperosmolarity in primary human corneal epithelial cells. *Mol Vis*. 2014;20:1243–52.
449. Chen Z, Tong L, Li Z, Yoon K-C, Qi H, Farley W, et al. Hyperosmolarity-induced cornification of human corneal epithelial cells is regulated by JNK MAPK. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(2):539–49.
450. Corrales RM, Luo L, Chang EY, Pflugfelder SC. Effects of osmoprotectants on hyperosmolar stress in cultured human corneal epithelial cells. *Cornea*. 2008;27(5):574–9.
451. Chen M, Hu D-N, Pan Z, Lu C-W, Xue C-Y, Aass I. Curcumin protects against hyperosmoticity-induced IL-1 β elevation in human corneal epithelial cell via MAPK pathways. *Exp Eye Res*. 2010;90(3):437–43.
452. Versura P, Profazio V, Schiavi C, Campos EC. Hyperosmolar stress upregulates HLA-DR expression in human conjunctival epithelium in dry eye patients and in vitro models. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(8):5488–96.
453. Redfern R, Barabino S, Baxter J, Lema C, McDermott A. Dry eye modulates the expression of toll-like receptors on the ocular surface. *Exp Eye Res*. 2015;134:80–9.
454. Tost F, Keiss R, Großjohann R, Jürgens C, Giebel J. Effect of different artificial tears against desiccation in cultured human epithelial cells. *Med Sci Monit*. 2012;18(5):BR188–92.
455. Zhan H, Towler HMAT, Calder VL. The immunomodulatory role of human conjunctival epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(9):3906–10.
456. De Saint Jean M, Brignole F, Feldmann G, Goguel A, Baudouin C. Interferon-gamma induces apoptosis and expression of inflammation-related proteins in Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40(10):2199–212.

457. Paolieri F, Battifora M, Riccio AM, Pesce G, Canonica GW, Bagnasco M. Intercellular adhesion molecule-1 on cultured human epithelial cell lines: influence of proinflammatory cytokines. *Allergy*. 1997;52(5):521–31.
458. Narayanan S, Glasser A, Hu Y-S, McDermott AM. The effect of interleukin-1 on cytokine gene expression by human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2005;80(2):175–83.
459. Yamagami H, Yamagami S, Inoki T, Amano S, Miyata K. The effects of proinflammatory cytokines on cytokine-chemokine gene expression profiles in the human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(2):514–20.
460. Stahl JL, Cook EB, Graziano FM, Barney NP. Differential and cooperative effects of TNFalpha, IL-1beta, and IFNgamma on human conjunctival epithelial cell receptor expression and chemokine release. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(5):2010–5.
461. Gamache DA, Dimitrijevic SD, Weimer LK, Lang LS, Spellman JM, Graff G, et al. Secretion of proinflammatory cytokines by human conjunctival epithelial cells. *Ocul Immunol Inflamm*. 1997;5(2):117–28.
462. Djalilian AR, Nagineni CN, Mahesh SP, Smith J a, Nussenblatt RB, Hooks JJ. Inhibition of inflammatory cytokine production in human corneal cells by dexamethasone, but not cyclosporin. *Cornea*. 2006;25(6):709–14.
463. Gao J, Sana R, Calder V, Calonge M, Lee W, Wheeler LA, et al. Mitochondrial permeability transition pore in inflammatory apoptosis of human conjunctival epithelial cells and T cells: effect of cyclosporin A. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(7):4717–33.
464. Albertsmeyer A, Kakkassery V, Spurr-Michaud S, Beeks O, Gipson I. Effect of pro-inflammatory mediators on membrane-associated mucins expressed by human ocular surface epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2010;90(3):444–51.
465. Paulsen F, Jäger K, Worlitzsch D, Bräuer L, Schulze U, Schäfer G, et al. Regulation of MUC16 by inflammatory mediators in ocular surface epithelial cell lines. *Ann Anat*. 2008;190(1):59–70.
466. Wang I-J, Wu C-Y, Hu F-R. Effect of proinflammatory cytokines on the human MUC5AC promoter activity in vitro and in vivo. *Clin Ophthalmol*. 2007;1(1):71–7.
467. Kim H-S, Shang T, Chen Z, Pflugfelder SC, Li D-Q. TGF-β1 stimulates production of gelatinase (MMP-9), collagenases (MMP-1, -13) and stromelysins (MMP-3, -10, -11) by human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2004;79(2):263–74.
468. Gordon GM, Ledee DR, Feuer WJ, Fini ME. Cytokines and signaling pathways regulating matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in corneal epithelial cells. *J Cell Physiol*. 2009;221(2):402–11.
469. Li S, Gallup M, Chen Y-T, McNamara NA. Molecular mechanism of proinflammatory cytokine-mediated squamous metaplasia in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 May;51(5):2466–75.
470. Contreras-Ruiz L, Ghosh-Mitra A, Shatos MA, Dartt DA, Masli S. Modulation of conjunctival goblet cell function by inflammatory cytokines. *Mediators Inflamm*. 2013;2013.
471. Meloni M, De Servi B, Marasco D, Del Prete S. Molecular mechanism of ocular surface damage: application to an in vitro dry eye model on human corneal epithelium. *Mol Vis*. 2011;17:113–26.
472. Lin H, Qu Y, Geng Z, Li C, Wu H, Dong N, et al. Air exposure induced characteristics of dry eye in conjunctival tissue culture. *PLoS One*. 2014;9(1):e87368.
473. Li W, Hayashida Y, Chen Y-T, He H, Tseng DY, Alonso M, et al. Air Exposure-Induced Squamous Metaplasia of Human Limbal Epithelium. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2008;49(1):154.
474. Choy EPY, To TSS, Cho P, Benzie IFF, Choy CKM. Viability of porcine corneal epithelium ex vivo and effect of exposure to air: a pilot study for a dry eye model. *Cornea*. 2004;23(7):715–9.
475. Hasegawa T, Amako H, Yamamoto T, Tazawa M, Sakamoto Y. Corneal-protective effects of an artificial tear containing sodium hyaluronate and castor oil on a porcine short-term dry eye model. *J Vet Med Sci*. 2014;76(9):1219–24.
476. Choy EPY, Cho P, Benzie IFF, Choy CKM, To TSS. A novel porcine dry eye model system (pDEM) with simulated lacrimation/blinking system: preliminary findings on system variability and effect of corneal drying. *Curr Eye Res*. 2004;28(5):319–25.
477. Choy EPY, Cho P, Benzie IFF, Choy CKM. Dry eye and blink rate simulation with a pig eye model. *Optom Vis Sci*. 2008;85(2):129–34.

478. Chan KY, Cho P, Boost M. Corneal epithelial cell viability of an ex vivo porcine eye model. *Clin Exp Optom*. 2014;97:337–40.
479. Hessen M, Akpek EK. Dry eye: an inflammatory disease. *J ophthalmic Vis Res*. 2014;9(2):240–50.
480. Pflugfelder SC. Antiinflammatory therapy for dry eye. *Am J Ophthalmol*. 2004;137(2):337–42.
481. Ramana Murthy M V, Mohan EVS, Sadhukhan a K. Cyclosporin-A production by *Tolypocladium inflatum* using solid state fermentation. *Process Biochem*. 1999;34(3):269–80.
482. Donnenfeld E, Pflugfelder SC. Topical ophthalmic cyclosporine: pharmacology and clinical uses. *Surv Ophthalmol*. 2009;54(3):321–38.
483. Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology*. 2000;47(2-3):119–25.
484. Rinschen MM, Klokkers J, Pavenstädt H, Neugebauer U, Schlatter E, Edemir B. Different effects of CsA and FK506 on aquaporin-2 abundance in rat primary cultured collecting duct cells. *Pflugers Arch*. 2011 Oct;462(4):611–22.
485. Lee JH, Kim JW, Im YS, Seong GJ, Lee HK. Cyclosporine A induces nerve growth factor expression via activation of MAPK p38 and NFAT5. *Cornea*. 2011;30(10, suppl1):S19–24.
486. Trama J, Lu Q, Hawley RG, Ho SN. The NFAT-Related Protein NFATL1 (TonEBP/NFAT5) Is Induced Upon T Cell Activation in a Calcineurin-Dependent Manner. *J Immunol*. 2000;165(9):4884–94.
487. Sheikh-Hamad D, Nadkarni V, Choi YJ, Truong LD, Wideman C, Hodjati R, et al. Cyclosporine A inhibits the adaptive responses to hypertonicity: a potential mechanism of nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(12):2732–41.
488. Li Y, Johnson N, Capano M, Edwards M, Crompton M. Cyclophilin-D promotes the mitochondrial permeability transition but has opposite effects on apoptosis and necrosis. *Biochem J*. 2004;383(Pt 1):101–9.
489. Waldmeier PC, Zimmermann K, Qian T, Tinteln-Bloomley M, Lemasters JJ. Cyclophilin D as a drug target. *Curr Med Chem*. 2003;10(16):1485–506.
490. Wan KH, Chen LJ, Young AL. Efficacy and Safety of Topical 0.05% Cyclosporine Eye Drops in the Treatment of Dry Eye Syndrome: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ocul Surf*. 2015;13(3):213–25.
491. Zhou XQ, Wei RL. Topical cyclosporine A in the treatment of dry eye: a systematic review and meta-analysis. *Cornea*. 2014;33(7):760–7.
492. Sacchetti M, Mantelli F, Lambiasi A, Mastropasqua A, Merlo D, Bonini S. Systematic review of randomised clinical trials on topical cyclosporin A for the treatment of dry eye disease. *Br J Ophthalmol*. 2013;98(8):1016–22.
493. Stonecipher K, Perry HD, Gross RH, Kerney DL. The impact of topical cyclosporine A emulsion 0.05% on the outcomes of patients with keratoconjunctivitis sicca. *Curr Med Res Opin*. 2005 Jul;21(7):1057–63.
494. Stevenson D, Tauber J, Reis BL. Efficacy and safety of cyclosporin A ophthalmic emulsion in the treatment of moderate-to-severe dry eye disease: a dose-ranging, randomized trial. The Cyclosporin A Phase 2 Study Group. *Ophthalmology*. 2000;107(5):967–74.
495. Sall K, Stevenson OD, Mundorf TK, Reis BL. Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease. CsA Phase 3 Study Group. *Ophthalmology*. 2000;107(4):631–9.
496. Laibovitz RA, Solch S, Andriano K, O'Connell M, Silverman MH. Pilot trial of cyclosporine 1% ophthalmic ointment in the treatment of keratoconjunctivitis sicca. *Cornea*. 1993;12(4):315–23.
497. Chen M, Gong L, Sun X, Xie H, Zhang Y, Zou L, et al. A Comparison of Cyclosporine 0.05% Ophthalmic Emulsion Versus Vehicle in Chinese Patients with Moderate to Severe Dry Eye Disease: An Eight-Week, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Parallel-Group Trial. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2010;26(4):361–6.
498. Byun Y-S, Rho CR, Cho K, Choi JA, Na KS, Joo C-K. Cyclosporine 0.05% ophthalmic emulsion for dry eye in Korea: a prospective, multicenter, open-label, surveillance study. *Korean J Ophthalmol*. 2011;25(6):369–74.
499. Sahli E, Hoşal BM, Zilelioğlu G, Gülbağçe R, Ustün H. The effect of topical cyclosporine A on clinical findings and cytological grade of the disease in patients with dry eye. *Cornea*. 2010;29(12):1412–6.
500. Perry HD. Evaluation of Topical Cyclosporine for the Treatment of Dry Eye Disease. *Arch Ophthalmol*. 2008;126(8):1046.
501. Yüksel B, Bozdağ B, Acar M, Topaloğlu E. Evaluation of the effect of topical cyclosporine A with impression cytology in dry eye patients. *Eur J Ophthalmol*. 2010 Jan;20(4):675–9.

502. Kunert KS, Tisdale AS, Gipson IK. Goblet cell numbers and epithelial proliferation in the conjunctiva of patients with dry eye syndrome treated with cyclosporine. *Arch Ophthalmol*. 2002;120(3):330–7.
503. Pflugfelder SC, De Paiva CS, Villarreal AL, Stern ME. Effects of Sequential Artificial Tear and Cyclosporine Emulsion Therapy on Conjunctival Goblet Cell Density and Transforming Growth Factor- β 2 Production. *Cornea*. 2008;27(1):64–9.
504. Deveci H, Kobak S. The efficacy of topical 0.05 % cyclosporine A in patients with dry eye disease associated with Sjögren’s syndrome. *Int Ophthalmol*. 2014 Jan;34(5):1043–8.
505. Kunert KS, Tisdale AS, Stern ME, Smith JA, Gipson IK. Analysis of Topical Cyclosporine Treatment of Patients With Dry Eye Syndrome : effect on conjunctival lymphocytes. *Arch Ophthalmol*. 2000;118(11):1489–96.
506. Kurt RA, Yalçındag N, Atilla H, Arat M. Topical cyclosporine-A in dry eye associated with chronic graft versus host disease. *Ann Ophthalmol (Skokie)*. 2009;41(3-4):166–9.
507. Malta JB, Soong HK, Shtein RM, Musch DC, Rhoades W, Sugar A, et al. Treatment of Ocular Graft-Versus-Host Disease With Topical Cyclosporine 0.05%. *Cornea*. 2010;29(12):1392–6.
508. Wang Y, Ogawa Y, Dogru M, Kawai M, Tatematsu Y, Uchino M, et al. Ocular surface and tear functions after topical cyclosporine treatment in dry eye patients with chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41(3):293–302.
509. Rao SN, Rao RD. Efficacy of Topical Cyclosporine 0.05% in the Treatment of Dry Eye Associated With Graft Versus Host Disease. *Cornea*. 2006;25(6):674–8.
510. Lelli GJ, Musch DC, Gupta A, Farjo QA, Nairus TM, Mian SI. Ophthalmic cyclosporine use in ocular GVHD. *Cornea*. 2006;25(6):635–8.
511. Torricelli AAM, Santhiago MR, Wilson SE. Topical Cyclosporine A Treatment in Corneal Refractive Surgery and Patients With Dry Eye. *J Refract Surg*. 2014;30(8):558–64.
512. Prabhasawat P, Tesavibul N, Mahawong W. A randomized double-masked study of 0.05% cyclosporine ophthalmic emulsion in the treatment of meibomian gland dysfunction. *Cornea*. 2012;31(12):1386–93.
513. Perry HD, Doshi-Carnevale S, Donnenfeld ED, Solomon R, Biser SA, Bloom AH. Efficacy of commercially available topical cyclosporine A 0.05% in the treatment of meibomian gland dysfunction. *Cornea*. 2006;25(2):171–5.
514. Egorova GB, Mitichkina TS, Fedorov AA, Shamsudinova AR. Topical cyclosporine for the treatment of ocular surface changes in contact lens wearers. *Vestn Oftalmol*. 2015;131(1):36–42.
515. Willen CM, McGwin G, Liu B, Owsley C, Rosenstiel C. Efficacy of cyclosporine 0.05% ophthalmic emulsion in contact lens wearers with dry eyes. *Eye Contact Lens*. 2008;34(1):43–5.
516. Galatoire O, Baudouin C, Pisella PJ, Brignole F. Flow cytometry in impression cytology during keratoconjunctivitis sicca: effects of topical cyclosporin A on HLA DR expression. *J Fr Ophtalmol*. 2003;26(4):337–43.
517. Turner K, Pflugfelder S, Ji Z, Feuer WJ, Stern M, Reis BL. Interleukin-6 levels in the conjunctival epithelium of patients with dry eye disease treated with cyclosporine ophthalmic emulsion. *Cornea*. 2000;19(4):492–6.
518. Toker E, Asfuroğlu E. Corneal and Conjunctival Sensitivity in Patients With Dry Eye: The Effect of Topical Cyclosporine Therapy. *Cornea*. 2010;29(2):133–40.
519. Morgan R V, Abrams KL. Topical administration of cyclosporine for treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 1991 Oct;199(8):1043–6.
520. Sansom J, Barnett KC, Neumann W, Schulte-Neumann A, Clerc B, Jegou JP, et al. Treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs with cyclosporine ophthalmic ointment: a European clinical field trial. *Vet Rec*. 1995;137(20):504–7.
521. Lekhanont K, Leyngold IM, Suwan-Apichon O, Rangsin R, Chuck RS. Comparison of Topical Dry Eye Medications for the Treatment of Keratoconjunctivitis Sicca in a Botulinum Toxin B-Induced Mouse Model. *Cornea*. 2007;26(1):84–9.
522. Strong B, Farley W, Stern ME, Pflugfelder SC. Topical cyclosporine inhibits conjunctival epithelial apoptosis in experimental murine keratoconjunctivitis sicca. *Cornea*. 2005;24(1):80–5.
523. Moore CP, McHugh JB, Thorne JG, Phillips TE. Effect of cyclosporine on conjunctival mucin in a canine keratoconjunctivitis sicca model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(3):653–9.
524. Jabs DA, Lee B, Burek CL, Saboori AM, Prendergast RA. Cyclosporine therapy suppresses ocular and lacrimal gland disease in MRL/Mp-lpr/lpr mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37(2):377–83.

525. Tsubota K, Fujita H, Tadano K, Takeuchi T, Murakami T, Saito I, et al. Improvement of lacrimal function by topical application of CyA in murine models of Sjögren's syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(1):101–10.
526. Tsubota K, Saito I, Ishimaru N, Hayashi Y. Use of topical cyclosporin A in a primary Sjögren's syndrome mouse model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(9):1551–9.
527. Kurtz RM, Elnor VM, Bian ZM, Strieter RM, Kunkel SL, Elnor SG. Dexamethasone and cyclosporin A modulation of human retinal pigment epithelial cell monocyte chemotactic protein-1 and interleukin-8. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38(2):436–45.
528. Tang-Liu DD-S, Acheampong A. Ocular pharmacokinetics and safety of ciclosporin, a novel topical treatment for dry eye. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(3):247–61.
529. Lallemand F, Felt-Baeyens O, Besseghir K, Behar-Cohen F, Gurny R. Cyclosporine A delivery to the eye: a pharmaceutical challenge. *Eur J Pharm Biopharm.* 2003;56(3):307–18.
530. Yavuz B, Bozdağ Pehlivan S, Ünlü N. An Overview on Dry Eye Treatment: Approaches for Cyclosporin A Delivery. *Sci World J.* 2012;2012:1–11.
531. Gupta C, Chauhan A. Drug transport in HEMA conjunctival inserts containing precipitated drug particles. *J Colloid Interface Sci.* 2010;347(1):31–42.
532. Acton AE, Beale AB, Gilger BC, Stoskopf MK. Sustained release cyclosporine therapy for bilateral keratoconjunctivitis sicca in a red wolf (*Canis rufus*). *J Zoo Wildl Med.* 2006 Dec;37(4):562–4.
533. Barachetti L, Rampazzo A, Mortellaro CM, Scevola S, Gilger BC. Use of episcleral cyclosporine implants in dogs with keratoconjunctivitis sicca: pilot study. *Vet Ophthalmol.* 2015;18(3):234–41.
534. Peng C-C, Chauhan A. Extended cyclosporine delivery by silicone-hydrogel contact lenses. *J Control Release.* 2011;154(3):267–74.
535. Gupta C, Chauhan A. Ophthalmic delivery of cyclosporine A by punctal plugs. *J Control Release.* 2011;150(1):70–6.
536. Di Tommaso C, Valamanesh F, Miller F, Furrer P, Rodriguez-Aller M, Behar-Cohen F, et al. A Novel Cyclosporin A Aqueous Formulation for Dry Eye Treatment: In Vitro and In Vivo Evaluation. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2012;53(4):2292.
537. Luschmann C, Herrmann W, Strauss O, Luschmann K, Goepferich A. Ocular delivery systems for poorly soluble drugs: an in-vivo evaluation. *Int J Pharm.* 2013 Oct;455(1-2):331–7.
538. Di Tommaso C, Torriglia A, Furrer P, Behar-Cohen F, Gurny R, Möller M. Ocular biocompatibility of novel Cyclosporin A formulations based on methoxy poly(ethylene glycol)-hexylsubstituted poly(lactide) micelle carriers. *Int J Pharm.* 2011;416(2):515–24.
539. Hermans K, Van Den Plas D, Schreurs E, Weyenberg W, Ludwig A. Cytotoxicity and anti-inflammatory activity of cyclosporine A loaded PLGA nanoparticles for ocular use. *Pharmazie.* 2014;69(1):32–7.
540. Aksungur P, Demirbilek M, Denkbaş EB, Vandervoort J, Ludwig A, Ünlü N. Development and characterization of Cyclosporine A loaded nanoparticles for ocular drug delivery: Cellular toxicity, uptake, and kinetic studies. *J Control Release.* 2011;151(3):286–94.
541. Khan W, Aldouby YH, Avramoff A, Domb AJ. Cyclosporin nanosphere formulation for ophthalmic administration. *Int J Pharm.* 2012;437(1-2):275–6.
542. Karn PR, Kim H Do, Kang H, Sun BK, Jin S-E, Hwang S-J. Supercritical fluid-mediated liposomes containing cyclosporin A for the treatment of dry eye syndrome in a rabbit model: comparative study with the conventional cyclosporin A emulsion. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:3791–800.
543. Rodriguez-Aller M, Kaufmann B, Guillarme D, Stella C, Furrer P, Rudaz S, et al. In vivo characterisation of a novel water-soluble Cyclosporine A prodrug for the treatment of dry eye disease. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;80(3):544–52.
544. Newton R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax.* 2000 Jul;55(7):603–13.
545. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med.* 2005;353(16):1711–23.
546. Liden J, Rafter I, Truss M, Gustafsson J-Å, Okret S. Glucocorticoid Effects on NF-κB Binding in the Transcription of the ICAM-1 Gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;273(3):1008–14.

547. Cato ACB, Nestl A, Mink S. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE*. 2002;2002(138):re9.
548. Lasa M, Abraham SM, Boucheron C, Saklatvala J, Clark AR. Dexamethasone causes sustained expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 and phosphatase-mediated inhibition of MAPK p38. *Mol Cell Biol*. 2002;22(22):7802–11.
549. Marsh P, Pflugfelder SC. Topical nonpreserved methylprednisolone therapy for keratoconjunctivitis sicca in Sjögren syndrome. *Ophthalmology*. 1999;106(4):811–6.
550. Lee H, Ryu I, Seo K, Hong S, Kim H, Kim E. Topical 0.1% Prednisolone Lowers Nerve Growth Factor Expression in Keratoconjunctivitis Sicca Patients. *Ophthalmology*. 2006;113(2):198–205.
551. Pflugfelder SC, Maskin SL, Anderson B, Chodosh J, Holland EJ, De Paiva CS, et al. A randomized, double-masked, placebo-controlled, multicenter comparison of loteprednol etabonate ophthalmic suspension, 0.5%, and placebo for treatment of keratoconjunctivitis sicca in patients with delayed tear clearance. *Am J Ophthalmol*. 2004;138(3):444–57.
552. Avunduk AM, Avunduk MC, Varnell ED, Kaufman HE. The comparison of efficacies of topical corticosteroids and nonsteroidal anti-inflammatory drops on dry eye patients: A clinical and immunocytochemical study. *Am J Ophthalmol*. 2003;136(4):593–602.
553. Yang C, Sun W, Gu Y. A clinical study of the efficacy of topical corticosteroids on dry eye. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2006;7(8):675–8.
554. Hong S, Kim T, Chung S-H, Kim EK, Seo KY. Recurrence after topical nonpreserved methylprednisolone therapy for keratoconjunctivitis sicca in Sjögren's syndrome. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2007;23(1):78–82.
555. Lee JH, Min K, Kim SK, Kim EK, Kim T. Inflammatory cytokine and osmolarity changes in the tears of dry eye patients treated with topical 1% methylprednisolone. *Yonsei Med J*. 2014;55(1):203–8.
556. Moore QL, De Paiva CS, Pflugfelder SC. Effects of Dry Eye Therapies on Environmentally Induced Ocular Surface Disease. *Am J Ophthalmol*. 2015;160(1):135–42.e1.
557. Schwiebert LM, Schleimer RP, Radka SF, Ono SJ. Modulation of MHC class II expression in human cells by dexamethasone. *Cell Immunol*. 1995;165(1):12–9.
558. De Paiva CS, Corrales RM, Villarreal AL, Farley W, Li D-Q, Stern ME, et al. Apical corneal barrier disruption in experimental murine dry eye is abrogated by methylprednisolone and doxycycline. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2006;47(7):2847.
559. Hongyok T, Chae J, Shin Y, Na D, Li L, Chuck R. Effect of Chitosan-N-Acetylcysteine Conjugate in a Mouse Model of Botulinum Toxin B-Induced Dry Eye. *Arch Ophthalmol*. 2009;127(4):525–32.
560. De Paiva CS, Corrales RM, Villarreal AL, Farley WJ, Li D-Q, Stern ME, et al. Corticosteroid and doxycycline suppress MMP-9 and inflammatory cytokine expression, MAPK activation in the corneal epithelium in experimental dry eye. *Exp Eye Res*. 2006;83(3):526–35.
561. Villani E, Garoli E, Termine V, Pichi F, Ratiglia R, Nucci P. Corneal Confocal Microscopy in Dry Eye Treated with Corticosteroids. *Optom Vis Sci*. 2015;92(9):e290–5.
562. McGhee CNJ, Dean S, Danesh-Meyer H. Locally administered ocular corticosteroids: benefits and risks. *Drug Saf*. 2002;25(1):33–55.
563. Carnahan MC, Goldstein DA. Ocular complications of topical, peri-ocular, and systemic corticosteroids. *Curr Opin Ophthalmol*. 2000;11(6):478–83.
564. Jung HH, Ji YS, Sung MS, Kim KK, Yoon KC. Long-Term Outcome of Treatment with Topical Corticosteroids for Severe Dry Eye Associated with Sjögren's Syndrome. *Chonnam Med J*. 2015 Apr;51(1):26.
565. Byun Y, Kim T, Kwon SM, Seo KY, Kim SW, Kim EK, et al. Efficacy of combined 0.05% cyclosporine and 1% methylprednisolone treatment for chronic dry eye. *Cornea*. 2012;31(5):509–13.
566. Chan CKM, Lam DSC. The comparison of efficacies of topical corticosteroids and nonsteroidal anti-inflammatory drops on dry eye patients: a clinical and immunocytochemical study. *Am J Ophthalmol*. 2004;137(6):1157–8; author reply.
567. Liu X, Wang S, Kao AA, Long Q. The effect of topical pranopfen 0.1% on the clinical evaluation and conjunctival HLA-DR expression in dry eyes. *Cornea*. 2012;31(11):1235–9.

568. Schechter BA. Ketorolac during the induction phase of cyclosporin-A therapy. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2006 Apr;22(2):150–4.
569. Aragona P, Stilo A, Ferreri F, Mabruci M. Effects of the topical treatment with NSAIDs on corneal sensitivity and ocular surface of Sjögren's syndrome patients. *Eye (Lond).* 2005;19(5):535–9.
570. He H, Liu Z, Lin Z, Liu X, He H, Xiao Q. Therapeutic effects of Pyranoprofen on the mouse dry eye induced by topical medication of Benzalkonium Chloride. *Zhonghua yan ke za zhi Chinese J Ophthalmol.* 2012;48(1):33–40.
571. Sawazaki R, Ishihara T, Usui S, Hayashi E, Tahara K, Hoshino T, et al. Diclofenac protects cultured human corneal epithelial cells against hyperosmolarity and ameliorates corneal surface damage in a rat model of dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(4):2547–56.
572. Zohar R, Nemcovsky CE, Kebudi E, Artzi Z, Tal H, Moses O. Tetracycline impregnation delays collagen membrane degradation in vivo. *J Periodontol.* 2004;75(8):1096–101.
573. Moses O, Shemesh A, Aboodi G, Tal H, Weinreb M, Nemcovsky CE. Systemic tetracycline delays degradation of three different collagen membranes in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(2):189–95.
574. Dalm D, Palm GJ, Aleksandrov A, Simonson T, Hinrichs W. Nonantibiotic properties of tetracyclines: structural basis for inhibition of secretory phospholipase A2. *J Mol Biol.* 2010 Apr 23;398(1):83–96.
575. Boyle JR, McDermott E, Crowther M, Wills AD, Bell PR, Thompson MM. Doxycycline inhibits elastin degradation and reduces metalloproteinase activity in a model of aneurysmal disease. *J Vasc Surg.* 1998;27(2):354–61.
576. Hanemaaijer R, Visser H, Koolwijk P, Sorsa T, Salo T, Golub LM, et al. Inhibition of MMP synthesis by doxycycline and chemically modified tetracyclines (CMTs) in human endothelial cells. *Adv Dent Res.* 1998;12(2):114–8.
577. Doughty MJ. On the prescribing of oral doxycycline or minocycline by UK optometrists as part of management of chronic Meibomian Gland Dysfunction (MGD). *Cont Lens Anterior Eye.* 2015 Sep;
578. Hoeprich PD, Warshauer DM. Entry of four tetracyclines into saliva and tears. *Antimicrob Agents Chemother.* 1974 Mar;5(3):330–6.
579. Yoo S-E, Lee D-C, Chang M-H. The effect of low-dose doxycycline therapy in chronic meibomian gland dysfunction. *Korean J Ophthalmol.* 2005;19(4):258–63.
580. Hoang-Xuan T. Ocular rosacea. *J Fr Ophtalmol.* 1999 May;22(4):467–74.
581. Frucht-Pery J, Chayet AS, Feldman ST, Lin S, Brown SI. The effect of doxycycline on ocular rosacea. *Am J Ophthalmol.* 1989;107(4):434–5.
582. Frucht-Pery J, Sagi E, Hemo I, Ever-Hadani P. Efficacy of doxycycline and tetracycline in ocular rosacea. *Am J Ophthalmol.* 1993;116(1):88–92.
583. Zengin N, Tol H, Gündüz K, Okudan S, Balevi S, Endoğru H. Meibomian gland dysfunction and tear film abnormalities in rosacea. *Cornea.* 1995;14(2):144–6.
584. Iovieno A, Lambiase A, Micera A, Stampacchiacchiere B, Sgrulletta R, Bonini S. In vivo characterization of doxycycline effects on tear metalloproteinases in patients with chronic blepharitis. *Eur J Ophthalmol.* 2009;19(5):708–16.
585. Shine WE, McCulley JP, Pandya AG. Minocycline effect on meibomian gland lipids in meibomianitis patients. *Exp Eye Res.* 2003;76(4):417–20.
586. Foulks GN, Borchman D, Yappert M, Kakar S. Topical azithromycin and oral doxycycline therapy of meibomian gland dysfunction: a comparative clinical and spectroscopic pilot study. *Cornea.* 2013;32(1):44–53.
587. Aronowicz JD, Shine WE, Oral D, Vargas JM, McCulley JP. Short term oral minocycline treatment of meibomianitis. *Br J Ophthalmol.* 2006;90(7):856–60.
588. Beardsley RM, De Paiva CS, Power DF, Pflugfelder SC. Desiccating Stress Decreases Apical Corneal Epithelial Cell Size-Modulation by the Metalloproteinase Inhibitor Doxycycline. *Cornea.* 2008;27(8):935–40.
589. Kim H-S, Luo L, Pflugfelder SC, Li D-Q. Doxycycline Inhibits TGF- β 1-Induced MMP-9 via Smad and MAPK Pathways in Human Corneal Epithelial Cells. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2005;46(3):840.
590. Nikodemova M, Watters JJ, Jackson SJ, Yang SK, Duncan ID. Minocycline Down-regulates MHC II Expression in Microglia and Macrophages through Inhibition of IRF-1 and Protein Kinase C (PKC) / β actin. *J Biol Chem.* 2007;282(20):15208–16.

591. Liu KC, Huynh K, Grubbs J, Davis RM. Autoimmunity in the Pathogenesis and Treatment of Keratoconjunctivitis Sicca. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2014;14(1):403.
592. McDermott AM, Perez V, Huang AJW, Pflugfelder SC, Stern ME, Baudouin C, et al. Pathways of corneal and ocular surface inflammation: a perspective from the cullen symposium. *Ocul Surf.* 2005;3(4 Suppl):S131–8.
593. Pflugfelder SC, de Paiva CS, Li D-Q, Stern ME. Epithelial-immune cell interaction in dry eye. *Cornea.* 2008;27(1):S9–11.
594. Beuerman RW, Stern ME. Neurogenic inflammation: a first line of defense for the ocular surface. *Ocul Surf.* 2005 Oct;3(4 Suppl):S203–6.
595. Meng ID, Kurose M. The role of corneal afferent neurons in regulating tears under normal and dry eye conditions. *Exp Eye Res.* 2013;117:79–87.
596. Dartt DA. Neural regulation of lacrimal gland secretory processes: relevance in dry eye diseases. *Prog Retin Eye Res.* 2009;28(3):155–77.
597. Anwar Z, Wellik SR, Galor A. Glaucoma therapy and ocular surface disease: current literature and recommendations. *Curr Opin Ophthalmol.* 2013;24(2):136–43.
598. Kojima R, Taniguchi H, Tsuzuki A, Nakamura K, Sakakura Y, Ito M. Hypertonicity-induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 through a novel cis-acting element and MAPK signaling pathways. *J Immunol.* 2010;184(9):5253–62.
599. Amparo F, Dastjerdi MH, Okanobo A, Ferrari G, Smaga L, Hamrah P, et al. Topical Interleukin 1 Receptor Antagonist for Treatment of Dry Eye Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Ophthalmol.* 2013;131(6):715–23.
600. Narayanan S, Manning J, Proske R, McDermott AM. Effect of Hyperosmolality on β -Defensin Gene Expression by Human Corneal Epithelial Cells. *Cornea.* 2006;25(9):1063–8.
601. Igarashi T, Fujimoto C, Suzuki H, Ono M, Iijima O, Takahashi H, et al. Short-time exposure of hyperosmolarity triggers interleukin-6 expression in corneal epithelial cells. *Cornea.* 2014;33(12):1342–7.
602. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol.* 2014;23(1):37–45.
603. Rossol M, Pierer M, Raulien N, Quandt D, Meusch U, Rothe K, et al. Extracellular Ca²⁺ is a danger signal activating the NLRP3 inflammasome through G protein-coupled calcium sensing receptors. *Nat Commun.* 2012;3:1329.
604. Miyake K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. *Int Immunopharmacol.* 2003;3(1):119–28.
605. Talreja J, Dileepan K, Puri S, Kabir MH, Segal DM, Stechschulte DJ, et al. Human conjunctival epithelial cells lack lipopolysaccharide responsiveness due to deficient expression of MD2 but respond after interferon-gamma priming or soluble MD2 supplementation. *Inflammation.* 2005;29(4-6):170–81.
606. Mao K, Chen S, Chen M, Ma Y, Wang Y, Huang B, et al. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Cell Res.* 2013;23(2):201–12.
607. Vyleta ML, Wong J, Magun BE. Suppression of ribosomal function triggers innate immune signaling through activation of the NLRP3 inflammasome. *PLoS One.* 2012;7(5):e36044.
608. Fernandez SF, Fung C, Helinski JD, Alluri R, Davidson BA, Knight PR. Low pH environmental stress inhibits LPS and LTA-stimulated proinflammatory cytokine production in rat alveolar macrophages. *Biomed Res Int.* 2013;2013:742184.
609. Chen H, Zhu J, Liu Y, Dong Z, Liu H, Liu Y, et al. Lipopolysaccharide Induces Chronic Kidney Injury and Fibrosis through Activation of mTOR Signaling in Macrophages. *Am J Nephrol.* 2015;42(4):305–17.
610. Nakao J, Fujii Y, Kusuyama J, Bandow K, Kakimoto K, Ohnishi T, et al. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) inhibits LPS-induced inflammatory responses of osteoblasts through TLR4–MyD88 dissociation. *Bone.* 2014;58:17–25.
611. Basso FG, Soares DG, Pansani TN, Turrioni APS, Scheffel DL, de Souza Costa CA, et al. Effect of LPS treatment on the viability and chemokine synthesis by epithelial cells and gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 2015;60(8):1117–21.
612. Zhu J-P, Wu K, Li J-Y, Guan Y, Sun Y-H, Ma W-J, et al. *Cryptosporidium parvum* polysaccharides attenuate LPS-induced expression of pro-inflammatory factors via the TLR2 signaling pathway in human alveolar epithelial cells. *Pharm Biol.* 2015;12:1–7.

613. Finney SJ, Leaver SK, Evans TW, Burke-Gaffney A. Differences in lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced cytokine/chemokine expression. *Intensive Care Med.* 2012;38(2):324–32.
614. Kimbrell MR, Warshakoon H, Cromer JR, Malladi S, Hood JD, Balakrishna R, et al. Comparison of the immunostimulatory and proinflammatory activities of candidate Gram-positive endotoxins, lipoteichoic acid, peptidoglycan, and lipopeptides, in murine and human cells. *Immunol Lett.* 2008;118(2):132–41.
615. Xie Q, Shen W-W, Zhong J, Huang C, Zhang L, Li J. Lipopolysaccharide/adenosine triphosphate induces IL-1 β and IL-18 secretion through the NLRP3 inflammasome in RAW264.7 murine macrophage cells. *Int J Mol Med.* 2014;34(1):341–9.
616. Park KP, Beck JS, Douglas IJ, Brown PD. Ca(2+)-activated K⁺ channels are involved in regulatory volume decrease in acinar cells isolated from the rat lacrimal gland. *J Membr Biol.* 1994;141(2):193–201.
617. Hazama A, Okada Y. Ca²⁺ sensitivity of volume-regulatory K⁺ and Cl⁻ channels in cultured human epithelial cells. *J Physiol.* 1988;402:687–702.
618. Ernest NJ, Weaver AK, Van Duyn LB, Sontheimer HW. Relative contribution of chloride channels and transporters to regulatory volume decrease in human glioma cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;288(6):C1451–60.
619. Diecke FP, Beyer-Mears A. A mechanism for regulatory volume decrease in cultured lens epithelial cells. *Curr Eye Res.* 1997;16(4):279–88.
620. Lambert IH, Hoffmann EK, Pedersen SF. Cell volume regulation: physiology and pathophysiology. *Acta Physiol (Oxf).* 2008;194(4):255–82.
621. Faff-Michalak L, Reichenbach A, Dettmer D, Kellner K, Albrecht J. K(+)-, hypoosmolarity-, and NH₄(+)-induced taurine release from cultured rabbit Müller cells: role of Na⁺ and Cl⁻ ions and relation to cell volume changes. *Glia.* 1994;10(2):114–20.
622. Vogler S, Grosche A, Pannicke T, Ulbricht E, Wiedemann P, Reichenbach A, et al. Hypoosmotic and glutamate-induced swelling of bipolar cells in the rat retina: comparison with swelling of Müller glial cells. *J Neurochem.* 2013;126(3):372–81.
623. Schliess F, Foster N, Görg B, Reinehr R, Häussinger D. Hypoosmotic swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes. *Glia.* 2004;47(1):21–9.
624. Lahet J-J, Lenfant F, Lecordier J, Bureau A, Duvillard L, Chaillot B, et al. Effects of various osmolarity on human red blood cells in terms of potassium efflux and hemolysis induced by free radicals. *Biomed Pharmacother.* 2008;62(10):697–700.
625. Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP, Izumo S. Tyrosine kinase activation is an immediate and essential step in hypotonic cell swelling-induced ERK activation and c-fos gene expression in cardiac myocytes. *EMBO J.* 1996;15(20):5535–46.
626. Nielsen M-B, Christensen ST, Hoffmann EK. Effects of osmotic stress on the activity of MAPKs and PDGFR-beta-mediated signal transduction in NIH-3T3 fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;294(4):C1046–55.
627. Chiri S, Bogliolo S, Ehrenfeld J, Ciapa B. Activation of extracellular signal-regulated kinase ERK after hypo-osmotic stress in renal epithelial A6 cells. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Aug;1664(2):224–9.
628. Schliess F, Sinning R, Fischer R, Schmalenbach C, Häussinger D. Calcium-dependent activation of Erk-1 and Erk-2 after hypo-osmotic astrocyte swelling. *Biochem J.* 1996;320(Pt1):167–71.
629. Kim RD, Darling CE, Cerwenka H, Chari RS. Hypoosmotic stress activates p38, ERK 1 and 2, and SAPK/JNK in rat hepatocytes. *J Surg Res.* 2000 May 1;90(1):58–66.
630. Varela D, Simon F, Riveros A, Jørgensen F, Stutzin A. NAD(P)H oxidase-derived H₂O₂ signals chloride channel activation in cell volume regulation and cell proliferation. *J Biol Chem.* 2004;279(14):13301–4.
631. Reinehr R, Görg B, Becker S, Qvarthava N, Bidmon HJ, Selbach O, et al. Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices. *Glia* [Internet]. 2007 May [cited 2015 Nov 6];55(7):758–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17352382>
632. Hubert A, Cauliez B, Chedeville A, Husson A, Lavoinne A. Osmotic stress, a proinflammatory signal in Caco-2 cells. *Biochimie.* 2004;86(8):533–41.
633. Farrugia G, Rae J. Effect of volume changes on a potassium current in rabbit corneal epithelial cells. *Am J Physiol.* 1993 May;264(5 Pt 1):C1238–45.

634. Capó-Aponte JE, Iserovich P, Reinach PS. Characterization of regulatory volume behavior by fluorescence quenching in human corneal epithelial cells. *J Membr Biol.* 2005;207(1):11–22.
635. Pan Z, Yang H, Mergler S, Liu H, Tachado SD, Zhang F, et al. Dependence of regulatory volume decrease on transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) expression in human corneal epithelial cells. *Cell Calcium.* 2008;44(4):374–85.
636. Wu X, Yang H, Iserovich P, Fischbarg J, Reinach PS. Regulatory volume decrease by SV40-transformed rabbit corneal epithelial cells requires ryanodine-sensitive Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. *J Membr Biol.* 1997;158(2):127–36.
637. Pan Z, Capó-Aponte JE, Zhang F, Wang Z, Pokorny KS, Reinach PS. Differential dependence of regulatory volume decrease behavior in rabbit corneal epithelial cells on MAPK superfamily activation. *Exp Eye Res.* 2007;84(5):978–90.
638. Schorn C, Frey B, Lauber K, Janko C, Strysio M, Keppeler H, et al. Sodium overload and water influx activate the NALP3 inflammasome. *J Biol Chem.* 2011;286(1):35–41.
639. Compan V, Baroja-Mazo A, López-Castejón G, Gomez AI, Martínez CM, Angosto D, et al. Cell volume regulation modulates NLRP3 inflammasome activation. *Immunity.* 2012;37(3):487–500.
640. Perregaux DG, Laliberte RE, Gabel CA. Human Monocyte Interleukin-1 Posttranslational Processing: Evidence of a volume-regulated response. *J Biol Chem.* 1996;271(47):29830–8.
641. Hatanaka E, Shimomi FM, Curi R, Campa A. Sodium chloride inhibits cytokine production by lipopolysaccharide-stimulated human neutrophils and mononuclear cells. *Shock.* 2007;27(1):32–5.
642. Choi S-H, Yoon Y-H, Kim J-Y, Moon S-W, Cho Y-D, Yeom J-W. The effect of hypertonic saline on mRNA of proinflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated polymorphonuclear cells. *Curr Ther Res Clin Exp.* 2014;19(76):58–62.
643. Gundersen Y, Ruud TE, Krohn CD, Sveen O, Lyngstadaas SP, Aasen AO. Impact of Hypertonic Saline on the Release of Selected Cytokines After Stimulation with Lps or Peptidoglycan in Ex Vivo Whole Blood from Healthy Humans. *Shock.* 2010;34(5):450–4.
644. Schaeffer V, Arbabi S, Garcia IA, Knoll ML, Cuschieri J, Bulger EM, et al. Role of the mTOR pathway in LPS-activated monocytes: influence of hypertonic saline. *J Surg Res.* 2011;171(2):769–76.
645. Kim J-Y, Choi S-H, Yoon Y-H, Moon S-W, Cho Y-D. Effects of hypertonic saline on macrophage migration inhibitory factor in traumatic conditions. *Exp Ther Med.* 2013 Jan;5(1):362–6.
646. Cuschieri J, Gourlay D, Garcia I, Jelacic S, Maier R V. Hypertonic preconditioning inhibits macrophage responsiveness to endotoxin. *J Immunol.* 2002;168(3):1389–96.
647. Kennedy MT, Higgins BD, Costello JF, Curtin WA, Laffey JG. Hypertonic saline reduces inflammation and enhances the resolution of oleic acid induced acute lung injury. *BMC Pulm Med.* 2008;8(9).
648. Wright FL, Gamboni F, Moore EE, Nydam TL, Mitra S, Silliman CC, et al. Hyperosmolarity invokes distinct anti-inflammatory mechanisms in pulmonary epithelial cells: evidence from signaling and transcription layers. *PLoS One.* 2014;9(12):e114129.
649. Huang L-Q, Zhu G-F, Deng Y-Y, Jiang W-Q, Fang M, Chen C-B, et al. Hypertonic saline alleviates cerebral edema by inhibiting microglia-derived TNF- α and IL-1 β -induced Na-K-Cl Cotransporter up-regulation. *J Neuroinflammation.* 2014;11:102.
650. Gilbard JP, Kenyon KR. Tear diluents in the treatment of keratoconjunctivitis sicca. *Ophthalmology.* 1985;92(5):646–50.
651. Aragona P, Di Stefano G, Ferreri F, Spinella R, Stilo A. Sodium hyaluronate eye drops of different osmolarity for the treatment of dry eye in Sjögren's syndrome patients. *Br J Ophthalmol.* 2002;86(8):879–84.
652. Troiano P, Monaco G. Effect of Hypotonic 0.4% Hyaluronic Acid Drops in Dry Eye Patients: A Cross-Over Study. *Cornea.* 2008;27(10):1126–30.
653. Lee HS, Ji YS, Yoon KC. Efficacy of hypotonic 0.18% sodium hyaluronate eye drops in patients with dry eye disease. *Cornea.* 2014;33(9):946–51.
654. Oh HJ, Li Z, Park S-H, Yoon KC. Effect of hypotonic 0.18% sodium hyaluronate eyedrops on inflammation of the ocular surface in experimental dry eye. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2014;30(7):533–42.

655. Wei Y, Gadaria-Rathod N, Epstein S, Asbell P. Tear cytokine profile as a noninvasive biomarker of inflammation for ocular surface diseases: standard operating procedures. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(13):8327–36.
656. Sullivan BD, Whitmer D, Nichols KK, Tomlinson A, Foulks GN, Geerling G, et al. An objective approach to dry eye disease severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(12):6125–30.
657. Lemp MA, Bron AJ, Baudouin C, Benítez Del Castillo JM, Geffen D, Tauber J, et al. Tear osmolarity in the diagnosis and management of dry eye disease. *Am J Ophthalmol.* 2011;151(5):792–8.
658. Versura P, Profazio V, Campos EC. Performance of tear osmolarity compared to previous diagnostic tests for dry eye diseases. *Curr Eye Res.* 2010;35(7):553–64.
659. Gilbard JP, Farris RL, Santamaria J. Osmolarity of tear microvolumes in keratoconjunctivitis sicca. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960).* 1978;96(4):677–81.
660. Liu H, Begley C, Chen M, Bradley A, Bonanno J, McNamara NA, et al. A link between tear instability and hyperosmolarity in dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(8):3671–9.
661. Gilbard JP. Human tear film electrolyte concentrations in health and dry-eye disease. *Int Ophthalmol Clin.* 1994;34(1):27–36.
662. Bellotti M, Bast W, Berra A, Bonetto FJ. Effects of osmolarity on human epithelial conjunctival cells using an electrical technique. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2011;249(12):1875–82.
663. Chen L, Li J, Guo T, Ghosh S, Koh SK, Tian D, et al. Global Metabonomic and Proteomic Analysis of Human Conjunctival Epithelial Cells (IOBA-NHC) in Response to Hyperosmotic Stress. *J Proteome Res.* 2015;19.
664. Teping C, Wiedemann B. The COMOD system. A preservative-free multidose container for eyedrops. *Klin Monbl Augenheilkd.* 1994;205(4):210–7.
665. Brana I, Calles A, LoRusso PM, Yee LK, Puchalski TA, Seetharam S, et al. Carlumab, an anti-C-C chemokine ligand 2 monoclonal antibody, in combination with four chemotherapy regimens for the treatment of patients with solid tumors: an open-label, multicenter phase 1b study. *Target Oncol.* 2015 Mar;10(1):111–23.

RÉSUMÉ

La sécheresse oculaire est une pathologie fréquente qui peut impacter fortement la qualité de vie des patients. D'origine multifactorielle complexe, elle présente de nombreuses étiologies et son diagnostic est difficile en raison de présentations cliniques variées, en termes de symptômes et de tests cliniques, et en l'absence d'un marqueur spécifique. En outre, elle ne bénéficie actuellement que d'une seule molécule thérapeutique, cependant non curative, la ciclosporine. Devenant un réel problème de santé publique, la recherche visant à une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à son apparition reste indispensable. L'état actuel des connaissances sur la sécheresse oculaire reconnaît à l'inflammation et à l'hyperosmolarité un rôle central. Ce travail de thèse a eu pour objectif d'étudier le comportement pro-inflammatoire des cellules conjonctivales dans un modèle *in vitro* classique de sécheresse oculaire induite par une hyperosmolarité saline. Nous avons ainsi montré que les cellules conjonctivales sécrètent une chimiokine pro-inflammatoire majeure, CCL2/MCP-1, et que cette induction est totalement sous la dépendance du facteur de transcription osmoprotecteur NFAT5/TonEBP ainsi que partiellement liée à la voie des MAPKs et de NFκB. Nous avons également observé que cette induction était en partie inhibée par la ciclosporine et la dexaméthasone. Nous avons ensuite complété ce travail par l'étude de l'inflammasome à la fois sur ces cellules et sur des monocytes, type cellulaire majeur ciblé par CCL2, en utilisant différents activateurs classiques dans le modèle d'hyperosmolarité. Nos résultats ont montré l'absence d'activation de l'inflammasome par l'hyperosmolarité seule. En revanche, l'hyperosmolarité aurait un rôle inhibiteur de l'inflammasome dans les monocytes. Ces résultats ouvrent des pistes nouvelles d'exploration afin de mieux comprendre les relations entre monocytes et cellules épithéliales de la conjonctive. Ils nous ont permis d'identifier le rôle incontournable de cellules épithéliales conjonctivales dans l'apparition ou le maintien de l'inflammation dans la pathologie et de caractériser certaines voies intracellulaires impliquées dans ce processus, ouvrant de nouvelles perspectives en termes de thérapeutiques.

Mots clés : Sécheresse oculaire, conjonctive, inflammation, hyperosmolarité.

ABSTRACT

Dry eye disease is a common condition that significantly impacts the quality of life of patients. It is a complex multifactorial disease with many etiologies and a diagnosis recognized as difficult due to the multiple clinical presentations in terms of symptoms and clinical tests, and lacking of a reliable and specific marker. There is currently only one therapeutic molecule to treat this disease, cyclosporin. However it is not curative. Dry eye disease is becoming an important public health problem and it is necessary to focus research on its underlying mechanisms, as they remain largely unknown. The current state of knowledge in dry eye disease recognizes inflammation and hyperosmolarity as central elements in the pathology. This work aimed to study the pro-inflammatory behavior of conjunctival cells in an *in vitro* model of dry eye disease by NaCl-induced hyperosmolarity. We showed that conjunctival cells secrete a major pro-inflammatory chemokine known as CCL2/MCP-1. This induction depends entirely on the osmoprotectant transcription factor NFAT5/TonEBP and is partially related to the MAPKs and the NFκB pathways. We showed that the process could be partially inhibited by cyclosporin and dexamethasone. We also studied the inflammasome in conjunctival cells and monocytes, the major cell type targeted by CCL2, using various classical inflammasome activators in this hyperosmolarity model. We did not observe any inflammasome activation induced by hyperosmolarity alone. On the other hand, hyperosmolarity shows signs of inhibiting inflammasome activation in monocytes. These results open new ways of understanding the relations between monocytes and conjunctival epithelial cells. They highlight the crucial role of the conjunctival epithelial cell type in the inflammation process in dry eye disease and make it possible to characterize intracellular pathways involved in this process, opening new therapeutic prospects.

Keywords: Dry eye disease, conjunctiva, inflammation, hyperosmolarity.