



HAL
open science

Une approche moléculaire *in vitro* de la sécheresse oculaire : intérêt de l'analyse lipidomique dans la recherche de marqueurs biologiques d'une pathologie

Romain Magny

► To cite this version:

Romain Magny. Une approche moléculaire *in vitro* de la sécheresse oculaire : intérêt de l'analyse lipidomique dans la recherche de marqueurs biologiques d'une pathologie. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03208106

HAL Id: dumas-03208106

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03208106>

Submitted on 5 Jul 2022

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
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le 23 juin 2020

Par Romain Magny

**Une approche moléculaire *in vitro* de la sécheresse oculaire :
intérêt de l'analyse lipidomique dans la recherche de
marqueurs biologiques d'une pathologie**

JURY

Président :

Pr Catherine Demailly-Mullié, Professeur des Universités

Membres :

Dr Françoise Brignole-Baudouin, Maître de Conférences des Universités,

Praticien Hospitalier

Pr Olivier Laprévote, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

Dr Nicolas Auzeil, Maître de Conférences des Universités

Thèse N°

Remerciements

Je remercie Madame le Professeur Catherine Demailly-Mullié d'avoir accepté la présidence de ce jury. Je vous remercie également pour votre soutien tout au long de mes études de Pharmacie, ainsi que pour vos précieux conseils.

Je remercie Monsieur le Docteur Nicolas Auzeil d'avoir accepté d'encadrer ce travail. Je vous remercie particulièrement, pour toutes ces heures d'encadrements, tant au niveau expérimental que rédactionnel.

Je remercie Madame le Docteur Françoise Brignole-Baudouin d'avoir accepté d'être membre de ce jury. Je vous remercie également de m'avoir tant transmis au cours de ces différentes années, ainsi que pour votre soutien et votre confiance au cours de ce projet.

Je remercie Monsieur le Professeur Olivier Laprévotte d'avoir accepté d'être membre de ce jury. Je vous remercie également de m'avoir fait confiance en acceptant ma candidature en Master 2 de Toxicologie. Je vous remercie également pour vos conseils avisés en spectrométrie de masse.

Je remercie Monsieur le Professeur Pascal Sonnet de m'avoir fait confiance en m'acceptant en filière industrie en 3^{ème} année.

Je remercie particulièrement le Professeur Christophe Baudouin et le Docteur Stéphane Melik-Parsadaniantz de m'avoir accueilli au sein de l'équipe S12 « Pathologie du segment antérieur de l'œil » à l'Institut de la Vision. Je remercie également l'ensemble des personnes ayant participé de près ou de loin au travail expérimental réalisé : Karima Kessal, Anne Regazzetti mais également toutes les personnes de l'Institut de la Vision et du laboratoire de chimie, toxicologie analytique et cellulaire.

Je tiens à remercier mes camarades de Pharmacie que j'ai pu rencontrer tout au long de mon cursus : Victor, Geoffrey, Bastien, Aymeric, Julien, Hélène, Victoria, Charles et tous ceux que je n'ai pas cités mais que je n'oublie pas.

Je remercie mes parents qui ont toujours cru en moi et qui m'ont donné la chance de réaliser mes projets. Merci d'être à mes côtés, vos conseils et votre dévouement représentent une force au quotidien.

Je remercie Camille pour son soutien quotidien depuis maintenant plus de six ans. Merci pour ta patience, ta compréhension et ta franchise. Merci d'être celle que tu es, à l'origine des bons moments passés et à venir.

Sommaire

1.	INTRODUCTION.....	2
2.	ÉLEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES.....	6
2.1.	Le globe oculaire.....	6
2.2.	La surface oculaire.....	7
2.2.1.	La cornée.....	7
2.2.2.	La conjonctive.....	8
2.2.3.	Le film lacrymal.....	9
2.2.4.	La glande lacrymale.....	10
2.2.5.	Les paupières.....	11
2.3.	La sécheresse oculaire.....	12
2.3.1.	Définition et physiopathologie.....	12
2.3.2.	Épidémiologie et facteurs de risque de la sécheresse oculaire.....	13
2.3.3.	Classification et étiologie de la sécheresse oculaire.....	14
2.3.4.	Traitement de la sécheresse oculaire.....	16
2.4.	Les lipides.....	21
2.4.1.	Classification des lipides.....	21
2.4.2.	Structures et biosynthèses des lipides.....	23
2.4.3.	Rôle cellulaire des lipides.....	27
2.5.	La lipidomique.....	30
2.5.1.	La lipidomique, une sous partie de la métabolomique.....	30
2.5.2.	Méthodologie de l'analyse lipidomique.....	32
2.5.3.	Analyse lipidomique et sécheresse oculaire.....	35
3.	MATERIELS ET METHODES.....	38
3.1.	Culture cellulaire.....	38
3.2.	Solutions d'exposition.....	38
3.3.	Immunomarquage par immunofluorescence indirecte.....	38
3.4.	Test de cytotoxicité.....	39

3.4.1.	Test de viabilité au Rouge Neutre	39
3.4.2.	Production d'espèces réactives de l'oxygène via la sonde H ₂ DCFDA	40
3.5.	Analyse lipidomique	40
3.5.1.	Préparation des échantillons et extraction des lipides	40
3.5.2.	Analyse lipidomique globale	41
3.5.3.	Analyse lipidomique ciblée : quantification des stérols.....	44
3.6.	Analyse d'expression génique.....	45
3.6.1.	Extraction des ARN totaux	45
3.6.2.	Transcription inverse (Reverse transcription).....	45
3.6.3.	qPCR.....	46
3.7.	Coloration des triglycérides	46
3.7.1.	Coloration à l'huile rouge.....	46
3.7.2.	Coloration au Rouge Nil	47
3.8.	Analyses statistiques	47
4.	RESULTATS.....	48
4.1.	Test de viabilité au Rouge Neutre.....	48
4.2.	Production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) via la sonde H₂DCFDA	49
4.3.	Analyse de l'expression de médiateurs inflammatoires	49
4.4.	Expression de protéines impliquées dans l'inflammation et l'apoptose	50
4.5.	Analyse lipidomique globale.....	52
4.5.1.	Analyses statistiques multivariées	53
4.5.2.	Annotation des lipides	54
4.6.	Analyse lipidomique ciblée.....	57
4.6.1.	Analyse lipidomique ciblée après exposition au BAK.....	57
4.6.2.	Analyse lipidomique ciblée après exposition à l'hyperosmolarité.....	58
4.7.	Expression d'enzymes impliquées dans la biosynthèse des lipides	59
4.7.1.	Expression après exposition au BAK	59
4.7.2.	Expression après exposition à l'hyperosmolarité	59
4.8.	Coloration des triglycérides	60

5.	DISCUSSION	62
5.1.	Choix et validation du modèle	62
5.1.1.	Etude de viabilité et choix des doses	62
5.1.2.	Modèles d'étude et surexpressions géniques de médiateurs inflammatoires	63
5.1.3.	Modèles d'étude et surexpressions protéiques de médiateurs inflammatoires	63
5.1.4.	Validation du modèle HCE-T/BAK-HO	64
5.2.	Modification du profil lipidique après exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité	64
5.2.1.	Exposition au BAK et à l'hyperosmolarité et modulation de la sous-classe des céramides.....	64
5.2.2.	Exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité et modulation de la sous-classe des Triglycérides.....	66
5.2.3.	Marqueurs d'intérêt potentiel d'exposition au BAK	67
5.3.	Modulation des stérols après exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité	67
5.3.1.	Effets du BAK sur le cholestérol cellulaire	67
5.3.2.	Modulations des oxystérols après exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité	68
6.	CONCLUSION	69
7.	BIBLIOGRAPHIE	71

Liste des abréviations

24-OH-Cho : 24-OH-Cholestérol
25-OH-Cho : 25-OH-Cholestérol
27-OH-Cho : 27-OH-Cholestérol
7-DHC : 7-Déhydrocholestérol
7-KC : 7-Kétocholestérol
7-OH-Cho : 7-OH-Cholestérol
AA : Acide arachidonique
ADNc : ADN complémentaire
AG : Acide gras
ARNt : ARN totaux
ASM : Analyses statistiques multivariées
BAK : Chlorure de Benzalkonium
BHT : 3,5-di-tert-4-butylhydroxytoluène
CCL2 : Chemokine Ligand 2
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
Cer : Céramide
CLPI : Chromatographie liquide à polarité de phase inversée
CLPN : Chromatographie liquide à polarité de phase normale
COX : Cyclo-oxygénase
CV : Coefficient de variation
CV-ANOVA : Validation croisée de l'analyse des variances
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
Desmo : Desmostérol
DG : Diacylglycérol
DGAT : Diacylglycerol acyltransférase
DHA : Acide docosahexaénoïque
DHCR7 : Déhydrocholestérol réductase
DMAPI : 4-(diméthyl-amino)phényl isocyanate
ECN : Nombre équivalent de carbone
EEL : Extraction liquide-liquide
ERO : Espèces réactives de l'oxygène
ESI : Electronébulisation
ESL : Extraction solide-liquide
FDR : False discovery rate
GalCer : Galactosyl Céramide
H₂DCFDA :Diacétate de dichlorodihydrofluorescéine 2',7'
HCE-T : Cellule humaine cornéenne épithéliale
HILIC : Chromatographie liquide à interaction hydrophile
HO : Hyperosmolaire

HRMS : Spectrométrie de masse haute résolution
IFN- γ : Interféron γ
IP3 : inositol triphosphate
LOX : Lipo-oxygénase
LP : lysophospholipides
 m/z : rapport masse sur nombre de charge
MG : Monoacylglycérol
MS : Spectrométrie de masse
NFATc : Nuclear Factor of Activated T cells
OPLS-DA : Analyse discriminante par les moindres carrés partiels orthogonales
PA : Acide phosphatidique
PBS : Phosphate Buffer Saline
PC : Phosphatidylcholine
PCA : Analyse en composante principale
PE : Phosphatidyléthanolamine
PG : Phosphatidylglycérol
PI : Phosphatidylinositol
PL : Glycérophospholipide
PLA₁ : Phospholipase A1
PLA₂ : Phospholipase A2
PLS-DA : Analyse discriminante par les moindres carrés partiels
PS : Phosphatidylsérine
QC : Contrôle Qualité
SGS : Syndrome de Gougerot-Sjögren
SL : Substituts lacrymaux
SM : Sphingomyéline
SO : Sécheresse oculaire
SVF : Serum de veau fétal
TG : Triacylglycérol
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
 t_R : temps de rétention
UPLC : Chromatographie liquide ultra performante

Introduction

1. Introduction

La sécheresse oculaire (SO) est une pathologie fréquente, sous-estimée et sous-diagnostiquée. Elle concerne environ 25% des motifs de consultation en ophtalmologie. Cette pathologie est liée à une altération du film lacrymal et concerne l'ensemble de la surface oculaire [1–3]. Son diagnostic, basé principalement sur un examen clinique, reste complexe du fait de l'absence de corrélation entre signes cliniques observés par le clinicien et symptômes rapportés par le patient [4]. L'arsenal thérapeutique actuel reste relativement restreint et est basé essentiellement sur l'utilisation de larmes artificielles pour lubrifier la surface oculaire. Dans les cas de formes plus sévères, les anti-inflammatoires stéroïdiens ou non peuvent également être administrés [2]. Néanmoins, ces derniers disposent d'une efficacité limitée et un traitement au long terme n'est pas envisageable, compte tenu des effets indésirables.

Les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la SO restent actuellement mal compris et nécessitent des explorations supplémentaires [3]. Les traits physiopathologiques centraux de la sécheresse oculaire sont l'instabilité du film lacrymal, l'hyperosmolarité, la mort des cellules épithéliales cornéennes et conjonctivales, et l'inflammation qui concourent à auto-entretenir le cercle vicieux de la sécheresse oculaire [1,2,5,6]. De plus, l'étiologie de la SO est particulièrement variée et multifactorielle. Elle inclut notamment des causes auto-immunes, comme dans le syndrome de Gougerot-Sjögren, des causes liées aux dysfonctionnements des glandes de Meibomius mais également des causes exogènes, telles que l'exposition à des agents environnementaux toxiques ou iatrogènes [6,7]. La SO peut effectivement être liée à l'exposition à des conservateurs des collyres multi-doses, recommandés par la Pharmacopée pour assurer la sécurité microbiologique, tels que le chlorure de benzalkonium (BAK). Le BAK, principal conservateur des collyres conservés, est un sel d'ammonium quaternaire aux propriétés détergentes et microbicides qui est également retrouvé dans les sprays désinfectants professionnels ou domestiques.

Les cellules épithéliales de la surface oculaire représentent une barrière physiologique qui joue un rôle clé dans la protection de l'œil. En effet, les cellules cornéennes et conjonctivales sont les premières impactées lors de l'altération du film lacrymal observée au cours de la SO. Au niveau moléculaire, de nombreux médiateurs impliqués dans la

physiopathologie de la sécheresse oculaire ont été décrits dans ces cellules à partir d'études *in vitro* ou *in vivo* [3,4,6]. En effet, des cellules cornéennes ou conjonctivales exposées au BAK ou à l'hyperosmolarité conduisent à des effets délétères avec activation des voies de l'apoptose ou du stress oxydant [8–11]. De plus, une augmentation de la production de cytokines telle que l'IL-1 β , le TNF α , l'IL-6, des chimiokines telles que CCL2 ou des metalloprotéases matricielles, médiateurs moléculaires pro-inflammatoires retrouvés dans la physiopathologie de la sécheresse oculaire, a été rapportée dans ces modèles [10,12].

Les processus inflammatoires et de morts cellulaires impliquent des seconds messagers qui incluent les lipides [13,14]. Effectivement, les lipides ne sont pas uniquement une source majeure de stockage d'énergie, ils représentent également des médiateurs importants des processus intracellulaires et intercellulaires. Depuis plusieurs années, certains de ces métabolites ont été décrits comme des « lipides bioactifs » et ont été associés à des pathologies chroniques comme le diabète, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, l'athérosclérose ou encore la sclérose en plaques [15–17]. Leur étude permet d'une part la compréhension de mécanismes physiopathologiques et d'autre part d'identifier des candidats biomarqueurs permettant de suivre l'avancée d'une pathologie. Dans le domaine de l'ophtalmologie, quelques études relatent le rôle des lipides dans la physiopathologie de certaines maladies. En effet, une augmentation du taux cellulaire de sphingolipides a été rapportée dans les cornées de patients diabétiques [18]. Concernant la sécheresse oculaire, des modifications de la composition lipidique du film lacrymal ont été décrites avec notamment une augmentation des céramides [19–22]. De plus, une revue sur le rôle des lipides dans les pathologies oculaires souligne l'importance du métabolisme des sphingolipides [23]. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a décrit les modulations des lipides des cellules épithéliales et leurs conséquences physiopathologiques sur la sécheresse oculaire.

Dans une première partie, une étude bibliographique sur la sécheresse oculaire sera consacrée aux éléments relatifs à la physiopathologie, l'épidémiologie, l'étiologie et la thérapeutique. Ensuite, la classification des lipides, leur métabolisme et l'importance de ces composés dans les processus de signalisation cellulaire sera présentée. Enfin, le principe et les principales étapes de l'analyse lipidomique seront exposés ainsi que les travaux préalablement effectués dans le domaine de la sécheresse oculaire.

Dans une seconde partie, la caractérisation des changements de composition lipidique dans une lignée cellulaire épithéliale cornéenne après exposition au BAK, principal conservateur des collyres ophtalmologiques, ou à l'hyperosmolarité, trait physiopathologique de la sécheresse oculaire, sera exposée. Dans cette étude, nous avons premièrement déterminé la valeur de la concentration osmolaire et de BAK à utiliser à partir de tests de cytotoxicité. Nous avons ensuite caractérisé l'expression de marqueurs inflammatoires et de stress cellulaires couramment retrouvés au cours de la sécheresse oculaire afin de valider notre modèle. A partir de ces données, nous avons réalisé une analyse lipidomique globale afin de caractériser qualitativement et quantitativement les changements du profil lipidique cellulaire consécutifs à l'hyperosmolarité et à l'exposition au BAK. Une analyse lipidomique ciblée, portant sur le cholestérol et certains de ses métabolites d'oxydation, a également été effectuée. Enfin, nous avons réalisé une étude d'expressions géniques d'enzymes impliquées dans la biosynthèse des lipides afin de confirmer les résultats obtenus en lipidomique.

Éléments bibliographiques

2. Éléments bibliographiques

2.1. Le globe oculaire

L'œil représente l'organe de la vision. Sa fonction majeure est de recevoir puis transformer les vibrations de la lumière en influx nerveux transmis au cerveau. L'œil humain est constitué d'un globe oculaire formé de trois enveloppes, appelées également tuniques, qui entoure le corps vitré (**Figure 1**).

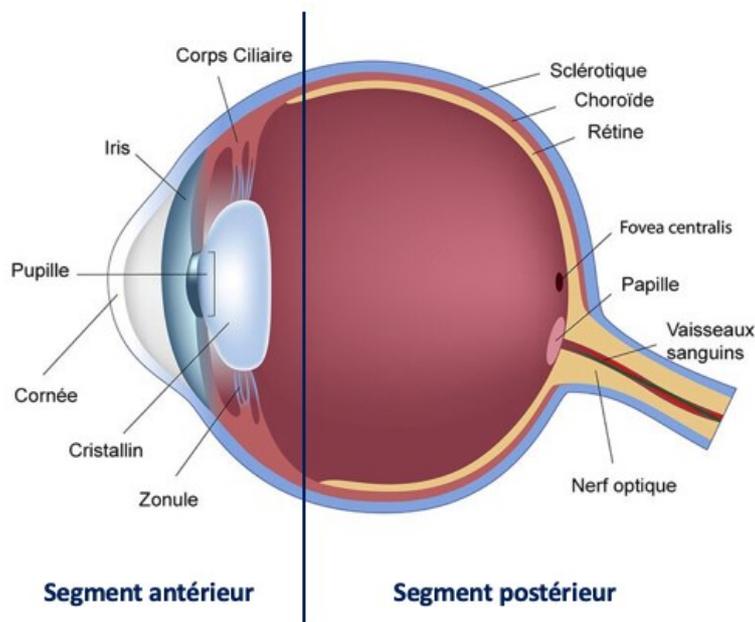


Figure 1 : Représentation du globe oculaire

Les trois tuniques de l'œil se composent de la sclère, la choroïde et la rétine. La sclère joue un rôle d'enveloppe de protection. La choroïde, quant à elle, représente la vasculaire nourricière tandis que la rétine, en contact direct avec l'humeur vitrée et tapissant le fond de l'œil, permet de transformer les rayons lumineux en influx nerveux. Au niveau macroscopique, le globe oculaire se divise en deux parties : le segment antérieur, qui comporte notamment le cristallin, la cornée, l'iris, la pupille et toute la surface oculaire et le segment postérieur composé notamment de la rétine, la choroïde, la fovéa et le nerf optique.

2.2. La surface oculaire

La surface oculaire se situe au niveau du segment antérieur de l'œil et constitue la couche la plus externe du globe oculaire (**Figure 2**). En contact direct avec le milieu extérieur, elle joue un rôle de défense contre les différentes agressions, en particulier celles d'origine environnementales ou pathogènes (virus, bactéries, champignons).

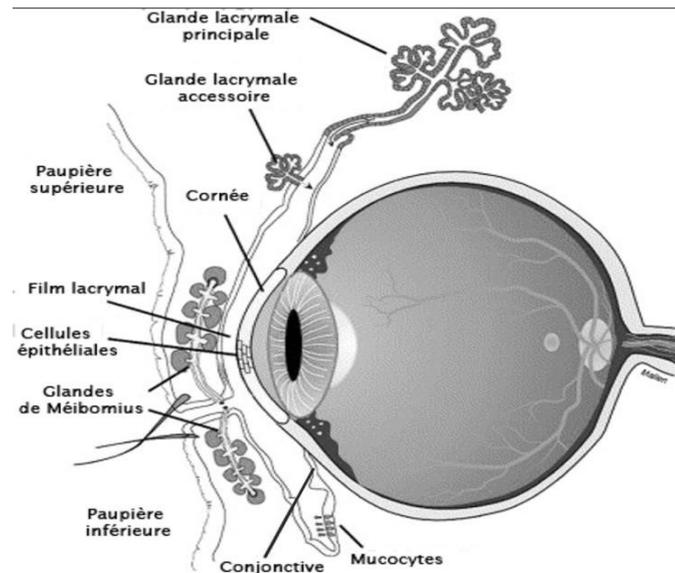


Figure 2 : Schéma de la surface oculaire [24]

Au niveau anatomique, la surface oculaire est composée de la cornée, de la conjonctive, des paupières, des cils, du film lacrymal, des glandes lacrymales principales et accessoires ainsi que des larmes [6]. Elle inclut également les jonctions cutané-muqueuses au niveau du bord de la paupière. Le film lacrymal représente un film continu sur toute la surface oculaire qui en assure l'hydratation. La production des différents éléments composant le film lacrymal ainsi que sa sécrétion sont sous le contrôle des glandes lacrymales principales et accessoires ainsi que, de façon minoritaire, de la conjonctive, des cellules à mucus et des glandes de Meibomius [2]. La figure 2 représente les différents éléments de la surface oculaire lorsque les paupières de l'œil sont fermées.

2.2.1. La cornée

La cornée est une lentille concave antérieure transparente qui permet le passage de la lumière vers le cristallin et la rétine. C'est une membrane transparente, avasculaire qui ne

contient aucune cellule inflammatoire en situation physiologique. De la couche la plus profonde à la plus superficielle, la cornée se compose de l'endothélium basal, de la membrane de Descemet, du stroma cornéen, de la couche de Bowman et enfin d'un épithélium pavimenteux pluristratifié reposant sur une membrane basale (**Figure 3**). La surface de l'épithélium cornéen est recouverte du film lacrymal qui assure d'une part son hydratation et d'autre part sa protection contre l'environnement extérieur.

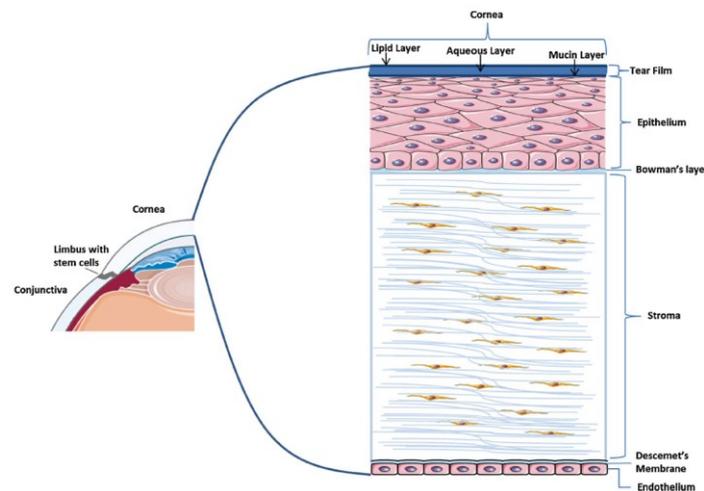


Figure 3. Représentation des couches de la cornée [25]

Le limbe est un anneau d'environ 3 mm de large qui se situe au niveau de la jonction entre les épithéliums conjonctivaux et cornéens. La transparence de la cornée, trait physiologique de ce tissu, est en partie due à la composition biochimique du stroma constitué de fibrilles de collagène de types I et IV [26].

2.2.2. La conjonctive

La conjonctive est un autre tissu retrouvé au niveau de la surface oculaire. La conjonctive est une membrane muqueuse. La conjonctive palpébrale, la conjonctive bulbaire et les culs-de-sac conjonctivaux représentent les trois régions de la conjonctive. La conjonctive palpébrale tapisse la face interne des paupières tandis que le cul-de-sac conjonctival correspond à la zone entre la conjonctive palpébrale et bulbaire. La conjonctive bulbaire, transparente et fine, possède deux parties : une partie étendue du cul-de-sac conjonctival au limbe et une partie limbique.

La conjonctive contient de nombreux vaisseaux sanguins et des cellules immunitaires capables de contribuer à la réaction inflammatoire. La conjonctive a ainsi un rôle majeur dans la protection de la surface oculaire et de l'œil. En formant une barrière physique et immunologique, la conjonctive permet la lutte contre l'intrusion potentielle d'agents pathogènes. Ce tissu est considéré comme un organe lymphoïde secondaire car des lymphocytes sont présents dans tout le tissu. Cette association forme le « tissu lymphoïde associé à la conjonctive » ou « conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) », et est responsable de la reconnaissance par les cellules immunitaires des antigènes et des allergènes.

2.2.3. Le film lacrymal

En contact direct avec les cellules épithéliales cornéennes et conjonctivales de la surface oculaire, le film lacrymal est constitué de trois couches. Il représente en situation physiologique une matrice homogène et fluide. De la couche la plus profonde à la plus superficielle, le film lacrymal se compose d'une phase muqueuse, d'une phase aqueuse et d'une phase lipidique (**Figure 4**).

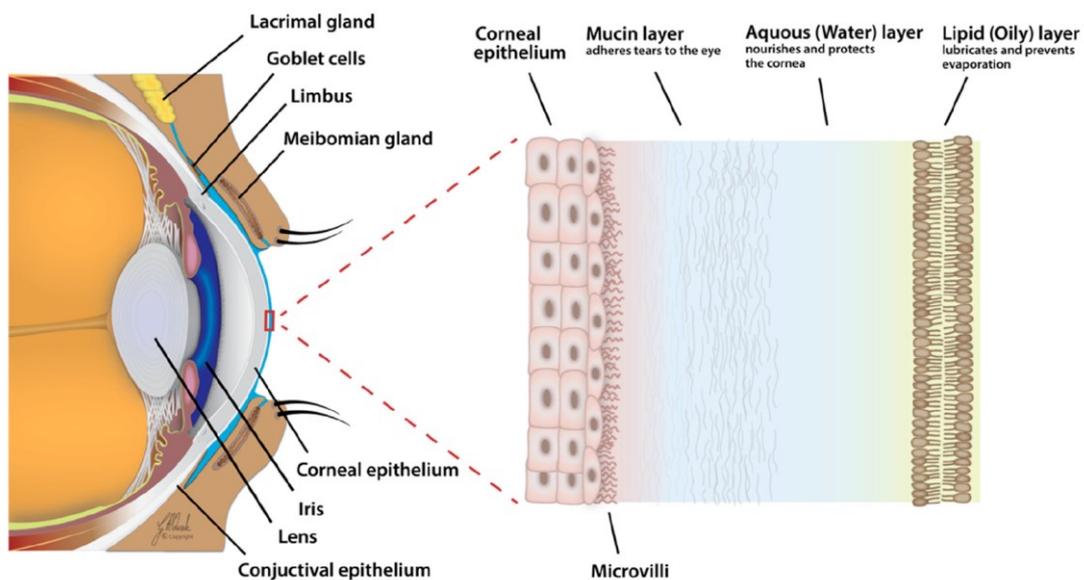


Figure 4 : Composition du film lacrymal [27]

La phase lipidique, couche la plus superficielle du film lacrymal, limite l'évaporation de la phase aqueuse et joue un rôle dans la dispersion du film lacrymal sur l'ensemble de la

surface oculaire. Elle est principalement synthétisée par les glandes de Meibomius. Cette phase est composée de nombreuses sous-classes de lipides, en particulier des esters de cires, des stérols, des triglycérides, des acides gras ainsi que des phospholipides [22,28–30]. Plusieurs études ont été consacrées à définir les différentes classes de lipides composant le film lacrymal et leurs modifications en situation pathologique, en particulier lors de SO [28,31].

La couche aqueuse, couche intermédiaire la plus volumineuse du film lacrymal, est produite par les glandes accessoires de Krause et Wolfring. Elle a pour rôle majeur de lubrifier la surface oculaire. Cette couche se compose majoritairement d'eau mais également de protéines, d'électrolytes, de cellules inflammatoires, de cytokines, d'hormones ou encore de facteurs de croissance.

Enfin, la couche muqueuse est composée d'un gradient de mucine soluble dont la concentration augmente en fonction de la profondeur. Les mucines sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire. Elles permettent l'adhésion de la couche aqueuse du film lacrymal aux cellules épithéliales de la surface oculaire. Les mucines épithéliales contribuent à la formation du glycocalyx et permettent la formation d'un gel qui participe à la stabilité du film lacrymal et à son ancrage au niveau de l'épithélium conjonctival et cornéen.

2.2.4. La glande lacrymale

Il existe deux types de glandes lacrymales appelées glande lacrymale principale et glandes lacrymales accessoires. La glande lacrymale principale est un tubule composé principalement de cellules acineuses mais également, en plus faible proportion, de cellules canalaire et myoépithéliales [6]. La glande lacrymale principale comprend un large lobe orbital et un petit lobe palpébral. Les canaux du lobe orbital débouchent au niveau du cul-de-sac conjonctival.

Concernant les glandes lacrymales accessoires, on distingue les glandes de Krause, situées au niveau du fornix, et les glandes de Wolfring, localisées dans la paupière supérieure et inférieure. La glande de Meibomius est responsable de la synthèse de la couche lipidique du film lacrymal ; elle fait également partie des glandes lacrymales accessoires. L'ensemble

des glandes lacrymales principales et accessoires est sous contrôle du nerf lacrymal qui correspond au nerf ophtalmique de Willis, une branche du nerf trijumeau.

2.2.5. Les paupières

Les paupières constituent une première ligne de défense physique de la surface oculaire et de l'œil. Ces replis cutané-muqueux ont un rôle de protection vis-à-vis de l'environnement extérieur contre les blessures, les corps étrangers ou la lumière. De plus, leurs clignements contribuent à répartir le film lacrymal de façon homogène sur toute la surface oculaire.

2.3. La sécheresse oculaire

2.3.1. Définition et physiopathologie

La sécheresse oculaire est une pathologie de la surface oculaire fréquente, généralement sous-estimée et sous-diagnostiquée, qui représente environ 25% des motifs de consultation dans les services d'ophtalmologie. Sa prévalence est comprise entre 5 et 35% chez les sujets âgés de plus de 50 ans [32]. Au niveau clinique, la maladie est caractérisée par des symptômes tels que des troubles visuels et d'anomalies neurosensorielles (sensation d'inconfort, de gêne, de brûlure, de douleur) qui retentissent sur la qualité de vie du patient [33]. L'œil sec est défini comme « une maladie multifactorielle des larmes et de la surface oculaire, entraînant des symptômes d'inconfort, une gêne visuelle et une instabilité du film lacrymal, avec un risque d'atteinte de la surface oculaire. Il s'accompagne d'une augmentation de l'osmolarité du film lacrymal et d'une inflammation de l'unité fonctionnelle que constitue la surface oculaire » [6].

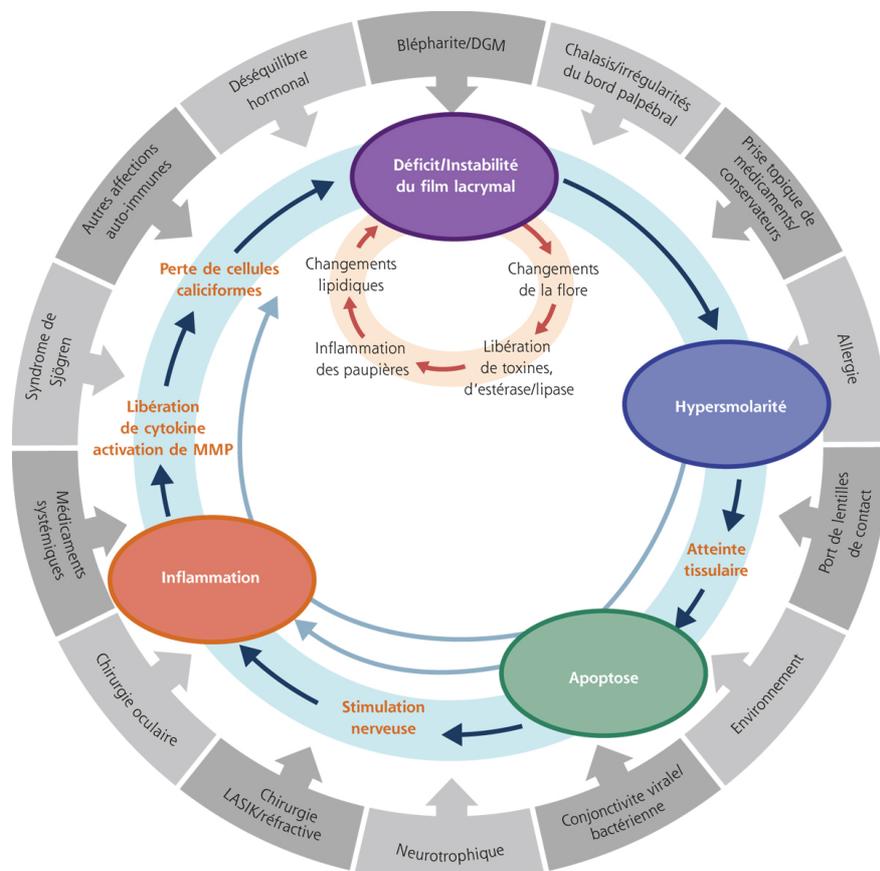


Figure 5 : Le cercle vicieux de la sécheresse oculaire [5]

L'instabilité du film lacrymal, l'hyperosmolarité, l'apoptose des cellules épithéliales cornéennes et conjonctivales et l'inflammation représentent les éléments principaux du cercle vicieux de la sécheresse oculaire (**Figure 5**). Cette altération du film lacrymal conduit à une hyperosmolarité, responsable d'une réaction cellulaire conduisant à l'apoptose des cellules cornéennes et conjonctivales. Cette mort conduit, via une stimulation nerveuse, à une inflammation dite neurogène qui s'accompagne de la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ , le TNF α , l'IL-1, l'IL-6 [3,34,35], et de l'activation des métalloprotéases matricielles [4,36]. Ces cytokines vont pouvoir recruter les cellules du système immunitaire qui concourent alors à l'inflammation de l'ensemble de la surface oculaire. De plus, les médiateurs inflammatoires et l'hyperosmolarité vont engendrer la perte de cellules caliciformes qui sont à l'origine de la production de mucines, protéines essentielles à la formation du glycocalyx et à la stabilité du film lacrymal. Ainsi, de nombreux médiateurs moléculaires et cellulaires sont impliqués dans la physiopathologie et contribuent à auto-entretenir le cercle vicieux de la sécheresse oculaire.

2.3.2. Épidémiologie et facteurs de risque de la sécheresse oculaire

2.3.2.1. Épidémiologie

Les études épidémiologiques de la SO sont relativement complexes et peu homogènes en raison de différents obstacles. L'existence de plusieurs définitions ou le manque de corrélation entre symptômes retranscrits par les patients et les observations cliniques par le médecin sont des obstacles à souligner. Il existe néanmoins plusieurs données épidémiologiques permettant d'apprécier la prévalence de la SO qui oscille entre 5 et 35% [37].

Au niveau mondial, la sécheresse oculaire est une pathologie qui touche plus de 100 millions de personnes [38]. Les principales études menées aux États-Unis ont rapporté une prévalence de la sécheresse oculaire d'environ 15% de la population [39–41]. De plus, environ 25% des consultations dans les services d'ophtalmologie aux États-Unis concernent un problème de SO. Au Japon, plusieurs études ont mis en évidence une prévalence d'environ 20% de syndromes secs [42]. En Chine, une prévalence de 20% de la population est rapportée dans les rapports épidémiologiques [43]. En Europe, la prévalence en France, en Allemagne,

en Italie, en Espagne et au Royaume-Uni semble relativement homogène, d'environ 15% [44,45].

2.3.3. Classification et étiologie de la sécheresse oculaire

La classification de la sécheresse oculaire (**Figure 6**) différencie les syndromes secs (1) par hyposécrétion et (2) par excès d'évaporation [6,46].

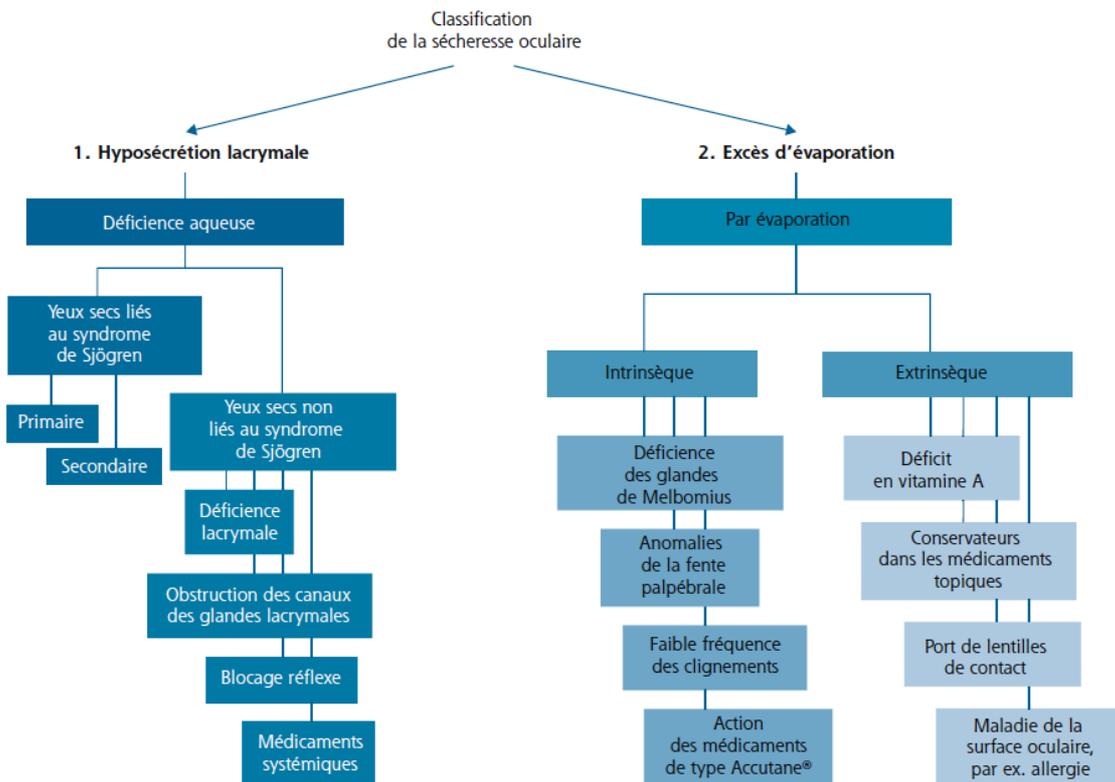


Figure 6 : Classification des syndromes secs [47]

2.3.3.1. Syndromes secs par hyposécrétion lacrymale

Parmi les sécheresses oculaires par hyposécrétion lacrymale, les syndromes secs liés aux syndromes de Gougerot-Sjögren (SGS) sont à distinguer. Le syndrome de Gougerot-Sjögren est une pathologie auto-immune inflammatoire chronique qui cible le système glandulaire exocrine. Au cours de cette pathologie, les glandes lacrymales et salivaires sont infiltrées par des lymphocytes T qui engendrent la mort des cellules des canaux excréteurs, ce qui conduit à une hyposécrétion lacrymale. Cette pathologie ne cible pas uniquement les glandes lacrymales mais également les glandes salivaires et autres glandes exocrines. Le SGS

représente la forme la plus sévère de SO. Cette maladie, qui reste relativement rare, touche environ 1 individu sur 10 000, avec une prévalence féminine, les femmes étant 10 fois plus touchées que les hommes.

Outre les syndromes secs auto-immuns tels que le SGS, les étiologies non auto-immunes incluent les défaillances lacrymales, l'obstruction des canaux des glandes lacrymales, le blocage réflexe ou encore l'effet de médicaments systémiques. Effectivement, certaines classes de médicaments pris par voie systémique ont un effet anticholinergique et engendrent ainsi une SO [48]. Il s'agit majoritairement de médicaments appartenant aux classes des antidépresseurs, des antihistaminiques, des anxiolytiques, des diurétiques et des rétinoïdes [48]. Il existe un caractère réversible du phénomène de SO induit par ces différents médicaments aux propriétés anticholinergiques lors de l'arrêt du traitement.

2.3.3.2. Syndromes secs par excès d'évaporation

Les syndromes secs par excès d'évaporation représentent la seconde grande classe de SO. Parmi ces syndromes, des causes palpébrales existent, notamment le dysfonctionnement des glandes de meibomius. Ce dysfonctionnement est caractérisé par une obstruction des canaux et un changement de la sécrétion glandulaire. Le dysfonctionnement des glandes de meibomius représente la principale cause de SO par excès d'évaporation [6].

De nombreuses causes extrinsèques sont responsables du syndrome sec par excès d'évaporation. L'exposition à des stress environnementaux tels que le port de lentilles de contact, certains polluants et allergènes, un déficit en vitamine A ou encore les conservateurs des préparations ophtalmiques peuvent induire ou aggraver une sécheresse oculaire [7,49–51].

Concernant l'exposition aux conservateurs des collyres, le chlorure de benzalkonium (BAK) représente le premier conservateur des collyres ophtalmiques et a une toxicité très bien décrite tant sur des modèles *in vitro* de cellules cornéennes et conjonctivales, *in vivo* chez la souris ou le lapin, mais également chez l'homme en clinique. Le BAK est un sel d'ammonium quaternaire aux propriétés détergentes et microbicides qui est aussi largement retrouvé dans les sprays désinfectants professionnels ou domestiques. La toxicité du BAK a été initialement décrite chez les patients glaucomateux contraints de s'administrer de façon journalière et

chronique des collyres conservés [49,52,53]. Le BAK agit sur des structures telles que la surface oculaire, incluant la conjonctive, la cornée, mais également des structures plus profondes, telles que le trabeculum ou la rétine [49,54]. Compte tenu de ses propriétés pro-inflammatoires et pro-apoptotiques, le BAK peut aggraver ou être responsable de la sécheresse oculaire [55–57].

2.3.4. Traitement de la sécheresse oculaire

Actuellement, le traitement de la sécheresse oculaire reste complexe en raison de mécanismes physiopathologiques variés qui ont limité le développement de thérapies ciblées. Il n'existe pas réellement de traitement de référence et celui de première intention repose principalement sur l'utilisation de substituts lacrymaux. Dans les formes les plus graves, le recours à des anti-inflammatoires ou au sérum autologue peut être envisagé.

2.3.4.1. Les substituts lacrymaux

Les substituts lacrymaux (SL) représentent le traitement de première intention de la sécheresse oculaire. Il s'agit de médicaments indispensables pour la prise en charge de plusieurs pathologies de la surface oculaire. L'objectif thérapeutique des SL est multiple et inclut l'augmentation du volume lacrymal, la lubrification la surface oculaire, la stabilisation du film lacrymal ou encore la diminution de l'hyperosmolarité lacrymale. Ainsi, ces traitements protègent de l'aspect dessiccateur de la pathologie, qui se traduit sur le plan cellulaire et moléculaire par une souffrance des cellules épithéliales de la surface oculaire. Il existe une grande diversité de spécialités de SL qui se différencient par les agents pharmacologiques.

La viscosité des SL conditionne le pouvoir rémanent. Cependant, des SL ayant une viscosité élevée peuvent engendrer des troubles visuels lors de l'instillation, ce qui nécessite une formulation adaptée. Les propriétés recherchées pour obtenir des SL efficaces sont : une rémanence importante, une forte viscosité et un pouvoir de rétention d'eau. Certains SL sont formulés pour être hypo-osmolaires afin de limiter l'hyperosmolarité lacrymale, trait physiopathologique de la maladie qui participe aux effets délétères sur les cellules et la surface oculaire et qui contribue à l'auto-entretien de la SO.

Parmi les SL, les principes pharmacologiques simples comportent notamment les solutions salines dérivées du sérum physiologique, les polyalcools vinyliques, les dérivés celluloses, les carbomères (acides polyacryliques), le hyaluronate de sodium ou encore les hydroxypropyl-guars. De nouveaux SL ont été développés et contiennent des osmoprotecteurs ou osmolytes compatibles. Ces osmolytes compatibles, tels que le tréhalose ou la levo-carnitine, s'accumulent dans les cellules et sous l'effet de l'hyperosmolarité, équilibrent le gradient osmotique au niveau de la membrane cellulaire [58].

2.3.4.2. La ciclosporine

La ciclosporine est un peptide cyclique de onze acides aminés qui est synthétisé par le champignon *Tolypocladium inflatum* (**Figure 7**). Elle a initialement été découverte dans un échantillon de sol en Norvège [59].

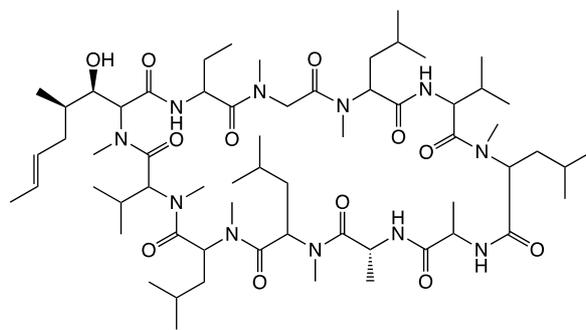


Figure 7 : Structure chimique de la ciclosporine A

La ciclosporine agit principalement en modulant l'activité des lymphocytes T (**Figure 8**). La présentation d'un antigène sur les récepteurs des cellules T entraîne une augmentation de la concentration de calcium dans le cytoplasme. Le calcium intracellulaire engendre alors l'activation de la calmoduline, protéine cytosolique, qui va se complexer avec la calcineurine. Ce complexe provoque la déphosphorylation du facteur de transcription NFATc (Nuclear Factor of Activated T cells) par son activité phosphatase. La forme déphosphorylée de NFATc peut ainsi transloquer dans le noyau et activer la transcription de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires telles que l'Interleukine 2 (IL-2), le $TNF\alpha$ ou encore l'interféron- γ (IFN- γ) [60].

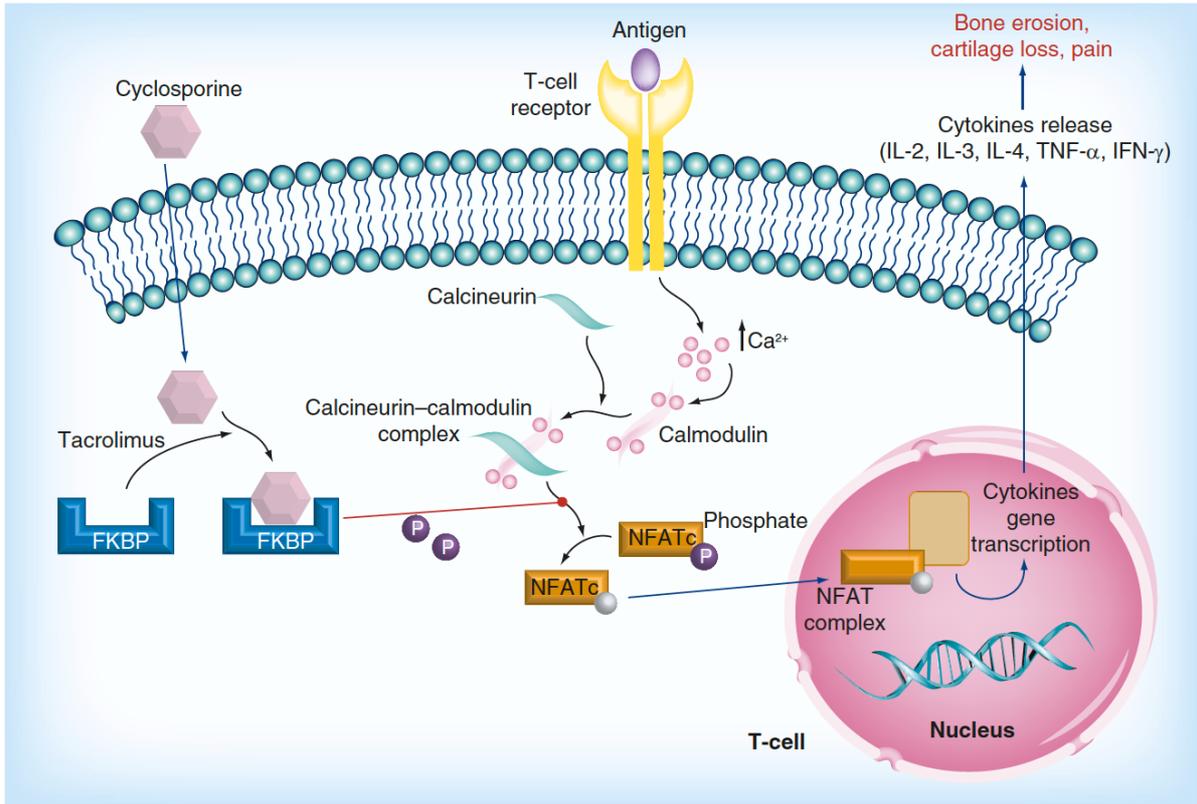


Figure 8 : Mécanisme d'action de la ciclosporine A [60]

Dans le cytoplasme des lymphocytes T, la ciclosporine va se lier à la cyclophiline A. Ce complexe va alors pouvoir inhiber l'activité phosphatase de la calcineurine. En empêchant la translocation de NFATc dans le noyau, la ciclosporine A va empêcher la transcription de l'IL-2 et d'autres cytokines pro-inflammatoires, réprimant donc les réponses immunitaires.

Ce traitement est indiqué dans les formes sévères de sécheresse oculaire. Il ne dispose pas d'autorisation de mise sur le marché en France mais est disponible grâce à la production hospitalière ou à des autorisations temporaires d'utilisation. Aux États-Unis, la spécialité pharmaceutique Restasis®, un collyre à 0,05% de ciclosporine, est la seule approuvée pour le traitement de la sécheresse oculaire. Administrée deux fois par jour, le principal effet indésirable rapporté est une sensation de brûlure lors de l'instillation du collyre [61].

2.3.4.3. Les anti-inflammatoires stéroïdiens

Les glucocorticoïdes sont des molécules largement utilisées dans les pathologies de la surface oculaire. Leur mécanisme d'action reste relativement non spécifique. Chimiquement,

les glucocorticoïdes, tels que le cortisol, possèdent un noyau stérane et ont pour précurseur biochimique le cholestérol (**Figure 9**).

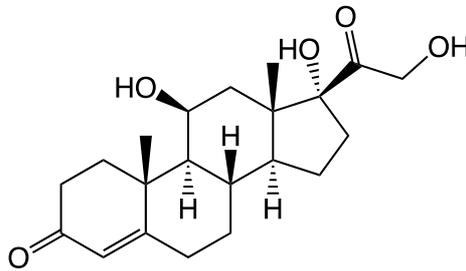


Figure 9 : Structure chimique du cortisol

Les glucocorticoïdes peuvent agir par voie génomique et non génomique [62]. Dans le cytoplasme de la cellule, le cortisol se lie à son récepteur, transloque dans le noyau et se fixe à la séquence « glucocorticoid responsive-element » pour induire la transcription d'ARNm codant pour des protéines aux propriétés anti-inflammatoires. Dans le noyau, une seconde voie génomique existe : le complexe cortisol / récepteur du cortisol interagit avec une séquence de l'élément NF- κ B et empêche la transcription d'ARNm codant pour des protéines pro-inflammatoires. Concernant la voie non génomique, la phosphorylation du complexe cortisol-récepteur du cortisol induit un système de second messager cytoplasmique qui aboutit à l'activation de protéines anti-inflammatoires [62,63]. Ce mécanisme reste néanmoins peu connu au niveau mécanistique.

L'utilisation de glucocorticoïdes dans le cadre de la prise en charge de la sécheresse oculaire se fait uniquement sur des traitements relativement courts, allant jusqu'à 4 semaines. Les effets indésirables peuvent être assez nombreux et incluent une réduction de la résistance aux infections virales, une hypertonie oculaire, un retard de cicatrisation, une ulcération cornéenne ou sclérale ou encore une cataracte sous capsulaire postérieure.

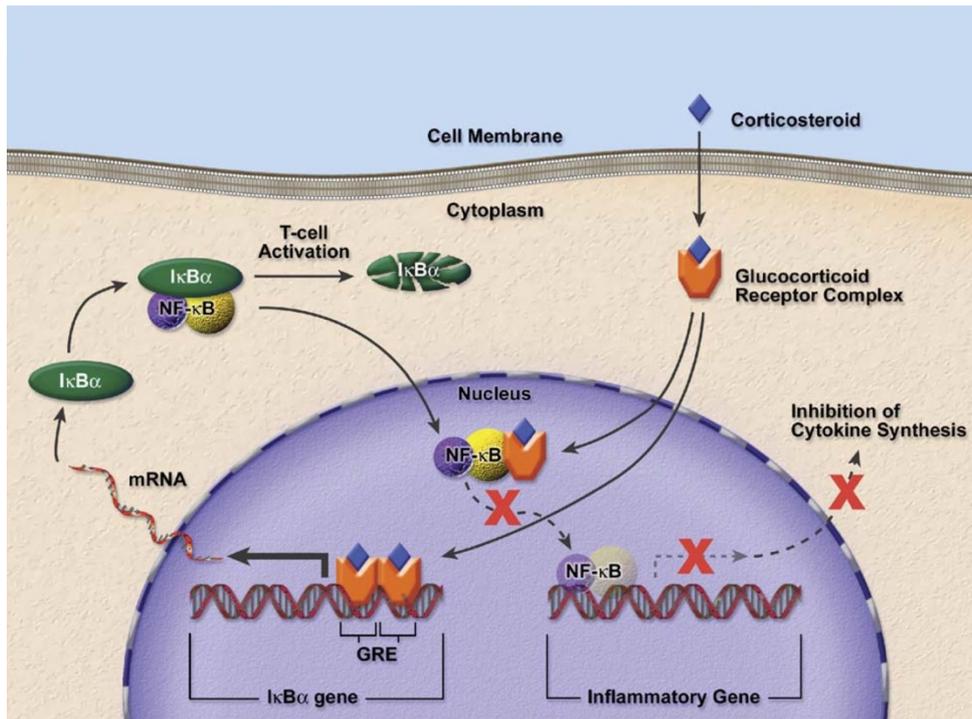


Figure 10 : Mécanisme d'action des glucocorticoïdes [62]

2.3.4.4. Le sérum autologue

Le collyre de sérum autologue représente un des traitements de choix de la sécheresse oculaire sévère [64]. Il se réalise dans une pharmacie hospitalière habilitée, à partir d'un prélèvement sanguin du patient. Le sérum est dans un premier temps isolé puis est dilué au 1/5 dans une solution physiologique saline. Le sérum autologue permet d'apporter au patient des facteurs de croissance, de la fibronectine, des immunoglobulines et des facteurs vitaminiques nécessaires à l'homéostasie de la surface oculaire. En outre, il permet de favoriser la cicatrisation cornéenne.

Les conditions de fabrication et de conservation représentent un des inconvénients majeurs de cette thérapie. En effet, il n'existe que quelques pharmacies hospitalières habilitées à la fabrication du sérum autologue. Le risque d'infection, principale complication du traitement à base de sérum autologue, est également une limite de ce traitement.

2.4. Les lipides

2.4.1. Classification des lipides

Les lipides sont des molécules hydrophobes de structures variées. Ces biomolécules ont longtemps été considérées comme secondaires, impliquées majoritairement dans le stockage énergétique. Néanmoins, la découverte du rôle des lipides dans un grand nombre de pathologies a engendré un intérêt croissant pour ces composés. De plus, le nombre de structures lipidiques différentes présent dans une cellule varie entre 1 000 à 100 000 espèces avec une concentration allant de l'amol/mg au nmol/mg de protéine [65].

Les lipides sont des métabolites. Ces composés ont longtemps été définis comme des molécules solubles dans les solvants organiques et peu solubles dans l'eau. Néanmoins, cette définition reste imprécise et partiellement vraie, compte tenu des diversités structurales de cette famille de composés. Plusieurs nomenclatures ont ainsi été décrites dont celle proposée en 2005 par le consortium LipidMaps® [66,67]. Cette nomenclature est fondée sur le concept des sous-unités biosynthétiques cétoacyles et isoprènes (**Figure 11**).

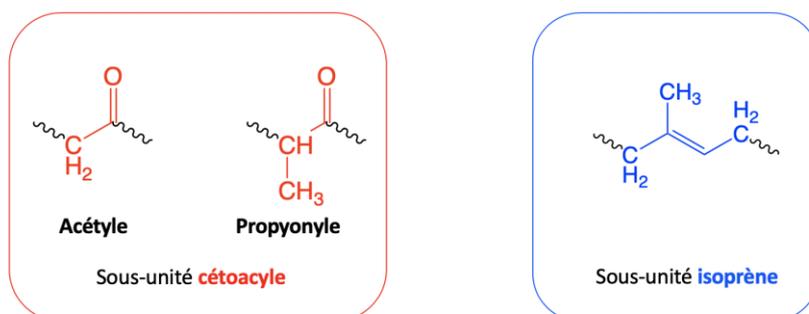
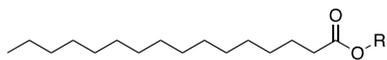
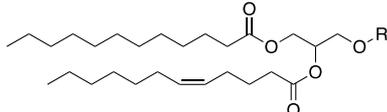
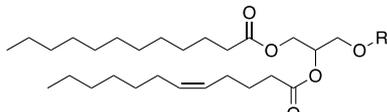
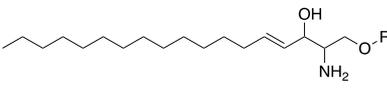
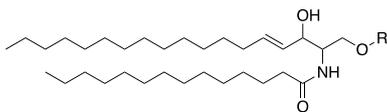
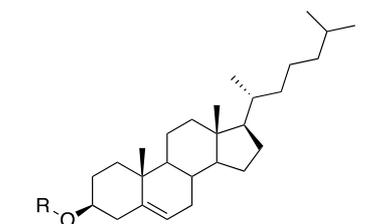


Figure 11 : Unités constitutives des lipides selon la nomenclature LipidMaps

La nomenclature LipidMaps a conduit à définir huit classes de lipides : les acides gras, les glycérolipides, les glycérophospholipides, les sphingolipides, les saccharolipides, les polycétides, les stérols et les prénoles. Chaque classe est composée de sous-classes, basées sur leurs propriétés chimiques. Le tableau 1 résume les structures des principaux acides gras glycérolipides, glycérophospholipides, sphingolipides et stérols. Un détail sur la nomenclature et sur le rôle cellulaire de ces cinq classes de lipides est présenté dans les sections suivantes.

Tableau 1 : Structures chimiques des lipides. La classification internationale distingue 8 classes de lipides : les acides gras, les glycérolipides, les glycérophospholipides, les sphingolipides, les stérols, les saccharolipides, les prénoles, les polykétides. Ces trois dernières classes ne sont pas listées. Tableau adapté de [68].

Classe	Structure	Substituant	Sous-classe
Acide gras		Hydrogène	Acide gras
		Alcool-Alkyle	Céride
Glycérolipides		Alkyle	Triacylglycérol
		Hydrogène	Diacylglycérol
Glycérophospho-lipides		Phosphate (P)	Acide phosphatidique
		P-Choline	Phosphatidylcholine
		P-Ethanolamine	Phosphatidyléthanolamine
		P-Sérine	Phosphatidylsérine
		P-Inositol	Phosphatidylinositol
		P-Glycérol	Phosphatidylglycérol
Sphingolipides		Hydrogène	Sphingosine
		Phosphate (P)	Sphingosine-1-Phosphate
		Hydrogène	Céramide
		Phosphate (P)	Céramide-1-Phosphate
		P-Choline	Sphingomyéline
		Glucose	Glucosyl-Céramide
		Lactose	Lactosyl-Céramide
		Galactose	Galactosyl-Céramide
Stérols		Hydrogène	Cholestérol
		Alkyle	Ester de Cholestérol
		Sulfate	Cholestérol Sulfate
		Autre modification	Oxystérol

2.4.2. Structures et biosynthèses des lipides

2.4.2.1. Les acides gras

Les acides gras (AG) sont des molécules caractérisées par une chaîne aliphatique, saturée ou non, et une tête hydrophile, composée d'une fonction carboxylique. Le nombre de carbone, majoritairement pair chez les mammifères, est compris entre 12 et 30 atomes pour les acides gras les plus abondants. Le nombre d'insaturation est compris entre 0 et 6 et permet de distinguer les acides gras saturés, mono-insaturés et poly-insaturés. Les AG saturés principalement retrouvés chez l'homme sont l'acide palmitique et l'acide stéarique composés de 16 et 18 atomes de carbone, respectivement [69]. Les AG mono-insaturés et poly-insaturés majoritairement présents sont les acides oléique, linoléique, linoléique, arachidonique et docosahexaénoïque [69].

Afin de nommer la longueur de chaîne et le nombre d'insaturations d'un AG, il existe une nomenclature abrégée. Elle se décompose sous la forme CX:Y où X représente le nombre total de carbone et Y le nombre d'insaturation. De plus, afin de connaître la position de l'insaturation, deux nomenclatures coexistent. La première nomenclature s'effectue en numérotant la chaîne aliphatique à partir du groupement carboxyle. Dans cette première nomenclature, le numéro du carbone qui porte une insaturation est donnée après le symbole Δ . La seconde numérotation s'effectue à partir du méthyle terminal, le numéro du premier carbone contenant une insaturation est donné après le symbole " ω ". Cette seconde nomenclature est largement utilisée dans le domaine de la nutrition, l'acide arachidonique, C20:4, ω -6, ou l'acide docosahexaénoïque, C22:6, ω -3, étant les deux exemples les plus connus en raison de leurs effets modulant l'inflammation (**Figure 12**).

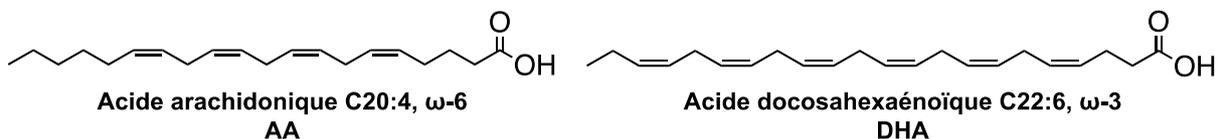


Figure 12 : Structure de l'acide arachidonique et docosahexaénoïque

Certains acides gras sont dits essentiels chez l'homme, car ils ne peuvent pas être synthétisés par la cellule, c'est le cas de l'acide linoléique. Ces AG essentiels sont les

précurseurs d'AG avec des chaînes comportant un nombre de carbone ou de doubles liaisons plus importants. Le métabolisme des AG fait intervenir des élongases, qui allongent de deux atomes de carbones les chaînes d'AG, mais également des désaturases, qui sont des oxydoréductases introduisant une double liaison dans une chaîne d'AG par déshydrogénation. Le métabolisme des AG inclut également des métabolites d'oxydation. Effectivement, les eicosanoïdes, dérivés oxydés des AG comportant 20 carbones, sont issus de l'acide arachidonique (AA). Les eicosanoïdes se divisent en trois sous-classes : les prostaglandines, les thromboxanes et les leucotriènes [70]. Les prostaglandines et les thromboxanes sont produits par action des cyclo-oxygénases (COX), qui sont notamment la cible de médicaments anti-inflammatoires, tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens. Les leucotriènes, quant à eux, sont produits grâce à des lipo-oxygénases (LOX).

2.4.2.2. Les glycérolipides

Structuralement, le squelette de base des glycérolipides repose sur le glycérol. Ce squelette comporte trois positions nommées sn_1 , sn_2 et sn_3 . Ce squelette de glycérol peut être estérifié par une, deux ou trois chaînes d'acides gras pour former des monoacylglycérols (MG), des diacylglycérols (DG) ou des triacylglycérols (TG) respectivement (**Figure 13**).

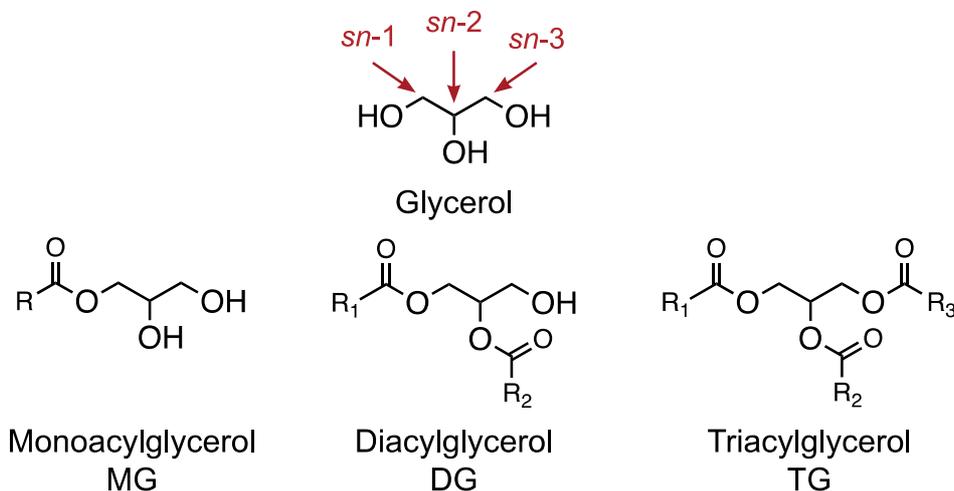


Figure 13 : Structure des glycérolipides

Les MG représentent majoritairement des intermédiaires du catabolisme ou de l'anabolisme des acides gras. Ces composés peuvent notamment provenir de l'hydrolyse des triglycérides sous l'action des lipases et représentent les glycérolipides les plus simples. Au

niveau métabolique, les DG sont des structures qui peuvent être synthétisées à partir des MG mais également à partir de l'acide phosphatidique. Cette seconde voie a pour précurseur biosynthétique le glycérol-phosphate, à l'origine également de la synthèse des phospholipides. Les TG sont des molécules qui sont produites à partir des DG par ajout d'une chaîne d'acide gras sous l'action de la diacylglycérol acyltransférase (DGAT) [71]. Les triglycérides sont les espèces responsables du stockage d'énergie dans les cellules humaines. Ces composés sont capables de stocker trois molécules d'AG qui, sous l'action des lipases, vont être libérées pour différents processus biologiques tels que la β -oxydation.

2.4.2.3. Les glycérophospholipides

Les glycérophospholipides ou phospholipides (PL) sont une classe de lipides composée de différentes sous-classes qui varient les unes des autres par la nature de la tête polaire. Le squelette de base de tous les PL repose sur le glycérol auquel est lié un groupement phosphate en position sn₃. Ainsi, le PL le plus simple est l'acide phosphatidique, sa tête polaire étant réduite au seul groupement phosphate (**Figure 14**). Les glycérophospholipides peuvent contenir une ou deux chaînes d'acides gras en position sn₁ et sn₂. L'acide gras en position sn₁ est généralement saturé ou mono-insaturé tandis que l'acide gras en position sn₂ peut être polyinsaturé. Dans le cas où le squelette de glycérol ne porte qu'une seule chaîne d'acide gras, le terme de lysophospholipide est utilisé.

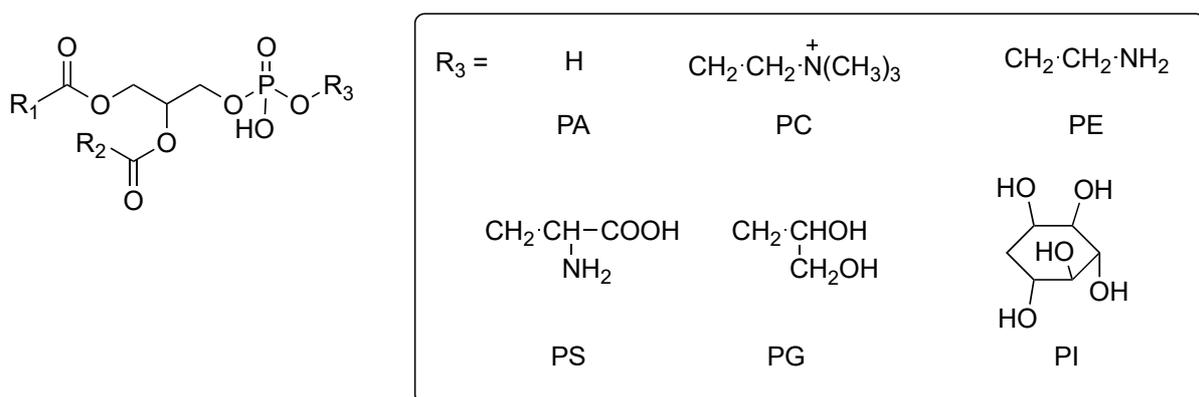


Figure 14 : Têtes polaires des différents groupes de glycérophospholipides

Concernant les PL des cellules mammifères, en particulier des cellules humaines, les phosphatidylcholines (PC) et les phosphatidyléthanolamines (PE) sont les composants majoritaires en masse. Ces lipides sont synthétisés par la voie de Kennedy, à partir de l'acide

phosphatidique (PA), par ajout de la tête polaire sur le phosphate en position sn₃ [72]. Une seconde voie de biosynthèse des phospholipides existe, par ré-acétylation d'un acide gras sur un lysophospholipide ; cette voie de recyclage s'appelle le cycle de Land [73].

Certains PL ont des chaînes latérales particulières, situées en position sn₁ et caractérisées par une liaison éther ou vinyl-éther. Ces lipides sont appelés respectivement plasmaléniques ou plasmalogènes [74]. Le terme d'alcool gras est alors généralement utilisé au lieu d'acide gras. Outre une structure moléculaire particulière, ces PL se distinguent par le lieu de biosynthèse, initiée dans les peroxysomes ainsi que leur rôle biologique. Effectivement, les plasmalogènes contiennent généralement des acides gras poly-insaturés en position sn₂, telles que l'acide arachidonique ou l'acide docosahexaénoïque, et jouent un rôle majeur dans l'équilibre de la balance inflammatoire cellulaire [74–76].

2.4.2.4. Les sphingolipides

Les sphingolipides tiennent leur nom du sphinx égyptien, en raison du caractère énigmatique de leurs structures lors de la découverte de ces composés. Ces lipides complexes sont caractérisés par un squelette de base composé d'une sphingosine auquel peut être liée une chaîne d'acide gras ce qui forme ainsi un céramide (**Figure 15**). L'ajout d'un groupement de phosphocholine sur un céramide produit une sphingomyéline (SM) tandis que l'ajout d'un galactose conduit à la formation d'un galactosylcéramide (GalCer) (**Figure 15**).

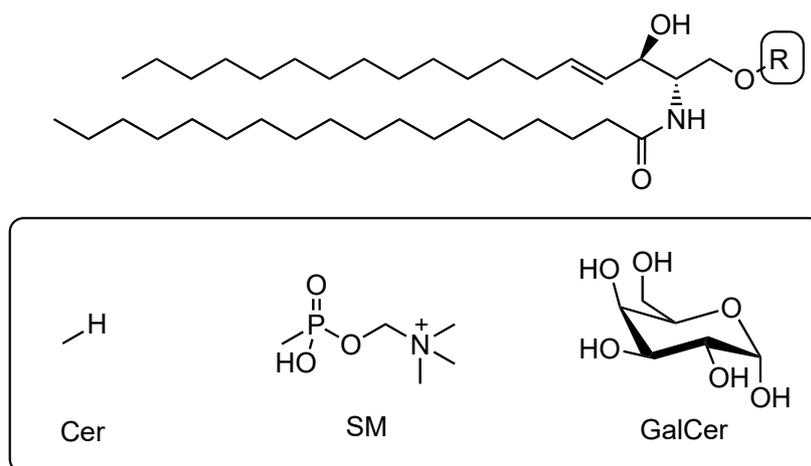


Figure 15 : Structure générale des sphingolipides

Les sphingolipides sont des molécules dont la biosynthèse est relativement complexe, les céramides se trouvant à un carrefour métabolique [77]. Premièrement, la synthèse *de novo* des céramides est initiée dans le réticulum endoplasmique des cellules à partir de la sérine et du palmitoyl CoA [78,79]. Elle inclut notamment des enzymes telles que les Céramides Synthases ou les dihydrocéramides desaturases [80]. Les céramides peuvent également être produits par hydrolyse des SM en céramides [81]. En outre, les céramides qui ont une tête polaire composée d'un ou plusieurs sucres, tels que les GalCer, peuvent également être transformés en céramide. Au niveau du catabolisme, les céramides peuvent être dégradés en sphingosine [82].

2.4.2.5. Les stérols

Les stérols sont une famille relativement large de composés et sont caractérisés par un noyau stérane (**Figure 16**). Le cholestérol représente le stérol le plus abondant dans les cellules humaines. Son précurseur biochimique est le squalène et sa voie de biosynthèse fait intervenir de nombreuses étapes [83]. En aval de la biosynthèse du cholestérol, lors de processus d'oxydation médié ou non par des cytochromes P450, le cholestérol peut être oxydé en oxystérols. Les sites d'oxydation du cholestérol sont nombreux et peuvent cibler aussi bien le noyau stérane que la chaîne aliphatique [84].

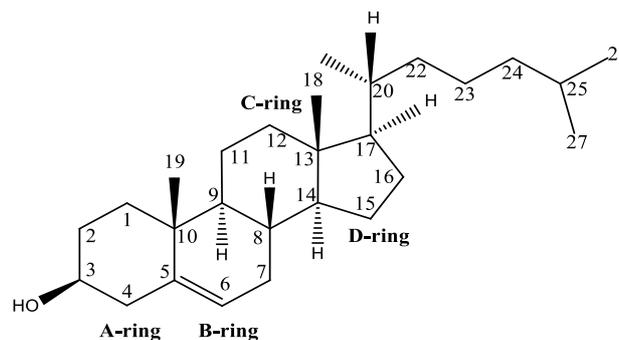


Figure 16 : Structure et numérotation du squelette carboné du cholestérol

2.4.3. Rôle cellulaire des lipides

Les lipides sont des constituants essentiels des cellules ; ils participent à la structure des membranes et des vésicules. Au-delà de leur fonction de stockage, ils remplissent également des fonctions de signalisation et peuvent agir comme seconds messagers. Certains lipides sont impliqués dans des processus inflammatoires et jouent un rôle dans la mort

cellulaire, apoptotique ou non [14,85]. Les principaux effets cellulaires que peuvent engendrer les AG, les phospholipides et les sphingolipides seront brièvement exposés dans les sous-sections suivantes.

2.4.3.1. Rôle de signalisation des acides gras et des phospholipides

Au niveau de la membrane plasmique, les phospholipides sont des métabolites directement impliqués dans les processus inflammatoires en réponse aux stimuli extracellulaires. Sous l'action de la phospholipase A₂ (PLA₂), les phospholipides peuvent libérer dans le cytoplasme des acides gras, tels que l'acide arachidonique (AA), qui, sous l'action de COX ou de LOX, va subir un processus d'oxydation pour former les eicosanoïdes. Les eicosanoïdes sont impliqués directement dans les processus inflammatoires et jouent un rôle majeur en tant que seconds messagers, avec une demi-vie très courte, de l'ordre de quelques minutes. Certains acides gras ont néanmoins des propriétés anti-inflammatoires tels que le DHA qui, une fois oxydé en marésines, protectines ou resolvines, va pouvoir inhiber les processus inflammatoires (**Figure 17**). Il existe donc une balance entre acide gras pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, ces derniers étant stockés dans les phospholipides membranaires et libérés sous l'action de la PLA₂.

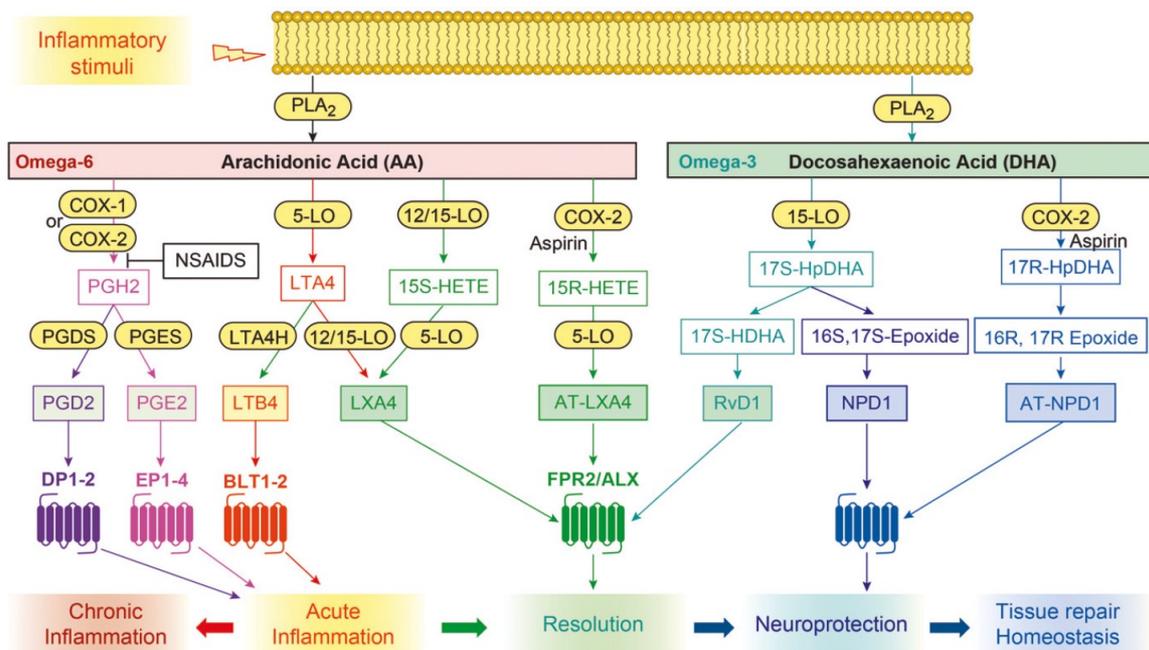


Figure 17 : Rôle des dérivés oxydés de l'acide arachidonique et de l'acide docohexadecanoïque [86]

Il existe, également au niveau de la membrane plasmique, une deuxième voie de signalisation cellulaire qui implique la phospholipase C. Sous l'effet de différents stress extracellulaires, les phosphatidylinositol-disphosphates vont être hydrolysés en DG et en inositol triphosphate (IP3) sous l'action de la phospholipase C. Le DAG, stocké dans la membrane plasmique, active une protéine kinase C, responsable de la phosphorylation de substrats cellulaires, et concourt à la propagation de la signalisation cellulaire. Concernant l'IP3, il se lie à son récepteur au niveau du réticulum endoplasmique et engendre la libération de calcium dans le cytoplasme des cellules. Cette libération de calcium a pour conséquence l'activation de protéines ayant des rôles dans les phénomènes de croissances, de différenciations, de migrations ou d'apoptoses.

2.4.3.2. Rôle biologique des sphingolipides

Les sphingolipides, et plus particulièrement les céramides, vont également pouvoir jouer un rôle de signalisation au sein de la cellule. Les céramides vont inhiber la phosphorylation d'AKT engendrant un effet sur la survie cellulaire [87]. Les céramides vont également activer les MAPK conduisant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires ou encore induire l'apoptose en activant la caspase 3 [87]. Les céramides peuvent également induire un stress du réticulum endoplasmique qui peut à son tour induire des processus cellulaires conduisant à des phénomènes de mort. Ainsi, les céramides jouent un rôle pivot au sein de la cellule en tant que molécule de signalisation.

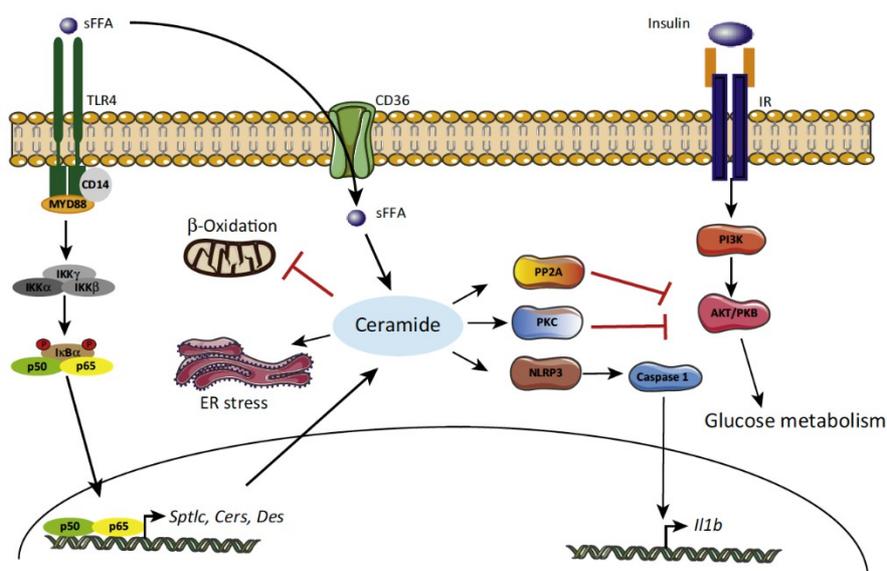


Figure 18 : Effets cellulaires médiés par les céramides [77]

2.5. La lipidomique

2.5.1. La lipidomique, une sous partie de la métabolomique

La métabolomique est une discipline relativement récente, apparue au début des années 2000. Elle se définit comme l'étude des « molécules de petites tailles » (**Figure 19**). Un métabolite peut être défini au sens large comme une molécule non encodée génétiquement. Ces molécules peuvent intervenir dans des réactions de production et d'utilisation de l'énergie, peuvent être des composés organiques de petites tailles présents dans les organismes vivants ou encore des produits de dégradation des médicaments. De plus, les métabolites peuvent être endogènes ou provenir de l'environnement extérieur. Ces différentes molécules forment ensemble le métabolome d'un système vivant.

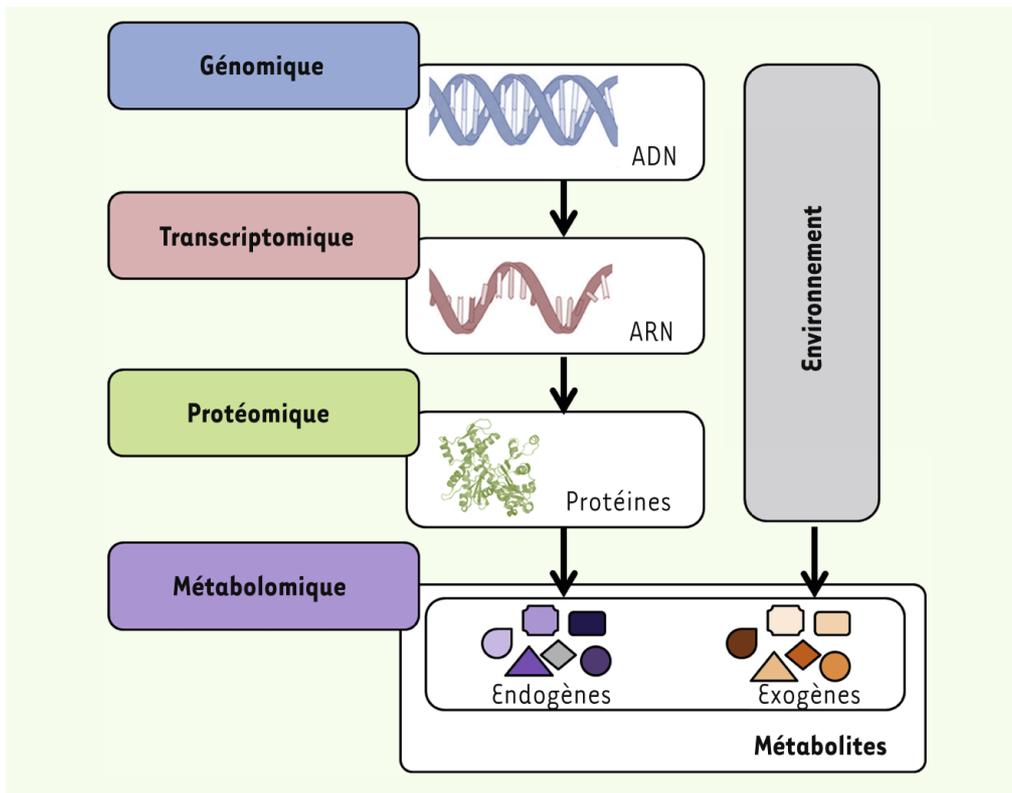


Figure 19 : Les cascades « omics » [88]

La métabolomique est une discipline qui se situe en aval de la génomique, de la transcriptomique et de la protéomique. La métabolomique est la plus récente des disciplines étudiant les cascades « omiques » (**Figure 20**).

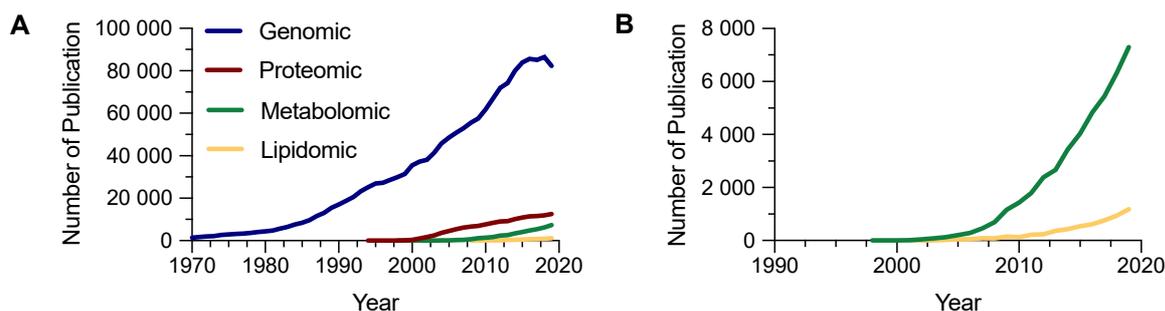


Figure 20 : Publications relatives aux différentes disciplines « omiques » sur PubMed

L'analyse lipidomique se définit comme l'analyse exhaustive des lipides dans un système biologique. Cette discipline représente une branche de la métabolomique, les lipides étant un sous-groupe du métabolome. Elle a pour but, en particulier dans le contexte de la recherche biomédicale, de mettre en évidence les lipides impliqués dans certaines pathologies [68].

L'émergence de la lipidomique, au début des années 2000, a été rendue possible par l'essor de la spectrométrie de masse (MS) [89]. En effet, les lipides sont des molécules qui sont difficilement analysables sans avoir recours à la MS. L'absence de structure aromatique ou conjuguée rend l'identification et la quantification des lipides impossible par des méthodes utilisant une détection par spectrophotométrie d'absorption UV-visible. Historiquement, les lipides ont été étudiés par chromatographie sur couche mince (CCM). Par CCM, les lipides sont séparés en fonction de leur appartenance à une sous-classe [90]. Ainsi, les TG seront regroupés au sein de la même tâche et seront distincts des autres sous-classes [90]. Cette technique dispose de certaines limites et ne permet pas l'identification moléculaire, telle que la détermination de la longueur de chaîne d'un phospholipide ou d'un sphingolipide. Elle permet néanmoins de quantifier les différentes sous-classes lipidiques présentes dans un échantillon. Le développement de la CCM « haute performance » offre des résultats rapides, reproductibles et fiables pour déterminer les différentes sous-classes de lipides présentes dans un échantillon biologique [91]. Les tests fonctionnels représentent une autre approche pour étudier les lipides. Néanmoins, ces tests sont relativement peu nombreux et ciblent les enzymes impliquées dans la biosynthèse d'un composé et non directement les lipides eux-mêmes. Concernant les méthodes d'imagerie n'utilisant pas la spectrométrie de masse, celles-ci ne sont généralement pas assez sensibles et spécifiques pour détecter des différences,

compte tenu de la faible concentration cellulaire de certains lipides. Enfin, la résonance magnétique nucléaire, technique non destructive permettant de quantifier les sous-classes de lipides dans un échantillon, manque de sensibilité et nécessite donc généralement des échantillons relativement concentrés [92]. Or, dans le cas de l'analyse d'échantillons biologiques, le matériel utilisé n'est généralement pas suffisamment abondant pour utiliser cette technique d'analyse. Ainsi, la MS est la technique spectrale de choix qui permet d'identifier et de quantifier un grand nombre de composés lipidiques présents en quantité relativement faible dans des échantillons biologiques.

2.5.2. Méthodologie de l'analyse lipidomique

L'analyse lipidomique se compose de plusieurs étapes (**Figure 20**). Une préparation d'échantillons est nécessaire afin d'obtenir un extrait lipidique qui sera analysé par une méthode appropriée, incluant une séparation et une détection des lipides présents dans cet extrait. Les données générées seront ensuite soumises à une étape de retraitement bio-informatique et d'analyses statistiques, nécessaires pour identifier et quantifier des lipides en lien avec une problématique biologique.

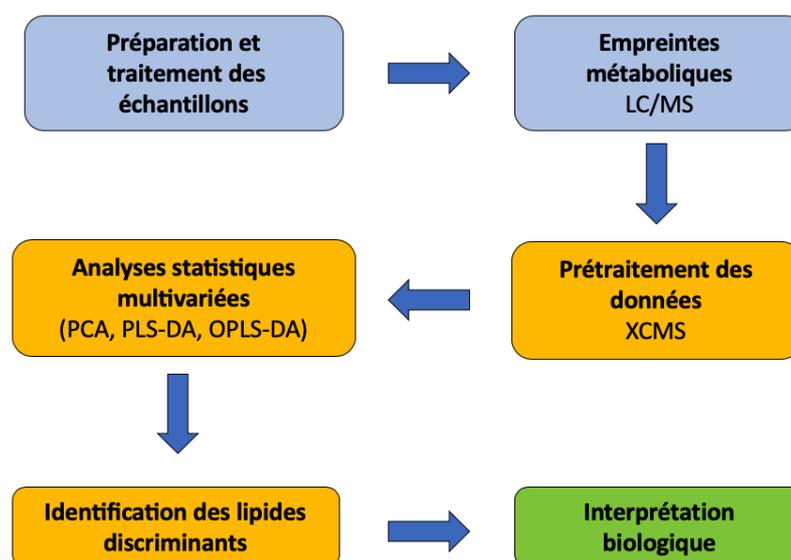


Figure 21 : Méthodologie générale de l'analyse lipidomique

2.5.2.1. Préparation des échantillons et extraction lipidique

Pour analyser les lipides dans un prélèvement tel que des cellules, un tissu ou un fluide biologique, il est nécessaire de recourir à des méthodes d'extraction préalable. Les deux principaux objectifs de cette étape sont de réduire la complexité de l'échantillon en se débarrassant de tous les composés non lipidiques, et de concentrer les analytes d'intérêts [93,94]. C'est une étape essentielle pour extraire un nombre important de composés lipidiques. Deux grandes méthodes d'extraction sont utilisées dans ce type d'analyse : les extractions liquides-liquides (ELL) et les extractions solides-liquides (ESL) [89].

Les ELL font généralement intervenir l'utilisation de solvants organiques hydrophobes tels que le chloroforme ou l'hexane pour extraire les lipides les plus hydrophobes. L'une des premières méthodes d'extraction des lipides a été proposée en 1957 par Folch [95]. Cette méthode emploie un mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (8/4/3, v/v/v) en proportion 20/1 (v/v) par rapport au volume d'échantillons. Cette méthode reste une méthode de référence pour extraire les lipides dans un échantillon biologique. Une méthode dérivée de Folch est désormais largement utilisée : il s'agit de la méthode de Bligh and Dyer [96]. Néanmoins, les considérations toxicologiques liées à la manipulation en quantité relativement importante de chloroforme, ont conduit au développement de méthodes moins toxiques, comme des méthodes d'extraction utilisant le Methyl-tert-butyl ether [97]. Ce solvant organique dispose d'une toxicité moindre que le chloroforme et les rendements d'extraction sont équivalents à ceux utilisant les méthodes de Folch ou de Bligh and Dyer [97].

2.5.2.2. L'empreinte métabolique

Une fois les lipides extraits, une analyse qualitative et quantitative peut être réalisée. L'utilisation de la SM pour l'identification et la quantification des lipides peut être réalisée avec ou sans méthode de séparation préalable.

Dans un premier cas, une approche appelée « shotgun » peut être utilisée. Les extraits lipidiques issus d'échantillons biologiques sont directement analysés par SM après ionisation par une source appropriée [98]. Cette technique présente plusieurs intérêts : elle est relativement simple et facilement adaptable pour les approches de type « criblage à haut débit » [99]. Elle permet d'avoir accès à plusieurs centaines de composés lipidiques présents dans un échantillon. Lors d'une telle analyse, les lipides sont identifiés uniquement sur la base

de leur rapport masse sur nombre de charge, ce qui rend le retraitement des données relativement aisé, une seule dimension étant à considérer. Néanmoins, cette approche présente plusieurs limites. D'une part, elle ne permet pas de distinguer les isomères, qui sont relativement nombreux au regard des différentes espèces lipidiques présentes dans un échantillon biologique [89,93]. D'autre part, elle est particulièrement sensible aux phénomènes de suppressions ioniques, ce qui engendre des biais dans la quantification et rend l'identification d'espèces peu abondantes relativement difficile [100].

Dans un second cas, la SM peut être couplée à des méthodes séparatives préalables telles que la chromatographie en phase gazeuse ou en phase liquide. La chromatographie en phase gazeuse est la méthode séparative qui a largement été utilisée pour l'analyse des acides gras, après trans-méthylation de ces derniers [101]. Néanmoins, la chromatographie en phase gazeuse nécessite généralement une dérivation des composés d'intérêts : la préparation des échantillons et l'analyse des résultats en sont donc plus complexes. Concernant la chromatographie liquide, l'avènement de l'électronébulisation comme source d'ionisation a grandement facilité son couplage à la SM [89]. Pour séparer les lipides avant leur introduction dans le SM, il est possible d'utiliser la chromatographie liquide à polarité de phase normale (CLPN), à interaction hydrophile (HILIC) ou à polarité de phase inversée (CLPI) [102,103]. Les deux premières techniques chromatographiques séparent les lipides selon l'appartenance à une sous-classe : par exemple, les PC seront élués dans un même intervalle de temps. La chromatographie liquide à polarité de phase inversée, quant à elle, permet de séparer les différentes espèces lipidiques en fonction de la longueur des chaînes d'acide gras composant les lipides d'intérêts [104–106]. La CLPN est peu compatible avec les SM car elle utilise des solvants très apolaires tels que l'hexane ou le chloroforme pour éluer les lipides. Si la CLPI a été largement utilisée pendant les quinze dernières années, la chromatographie HILIC a récemment gagné en intérêt dans le cadre d'analyses lipidomiques [103,107]. De façon générale, lors d'une analyse lipidomique utilisant la chromatographie liquide couplée à la SM, le retraitement des données obtenues est généralement plus complexe car le temps de rétention ajoute une dimension supplémentaire à l'analyse des résultats [106]. Néanmoins, l'utilisation de la chromatographie permet de diminuer les phénomènes de suppressions ioniques, d'identifier des espèces faiblement présentes dans les échantillons biologiques ainsi

que de séparer certains isomères ce qui représente un avantage majeur dans l'identification des lipides [93].

2.5.2.3. Méthodes de retraitement des données

Les analyses lipidomiques engendrent une quantité de données importantes qui nécessite des retraitements afin de transformer ces données en informations exploitables. Ces méthodes sont nombreuses et sont fondées sur l'utilisation de solutions bio-informatiques. Néanmoins, la méthodologie du retraitement des données reste toujours semblable. En effet, l'objectif premier est d'extraire l'ensemble des variables détectées par le système analytique, c'est-à-dire le temps de rétention chromatographique, le rapport masse sur nombre de charge et l'aire sous la courbe ou l'intensité. Pour cela, les grandes étapes incluent l'extraction des variables par des algorithmes afin de construire et organiser une matrice informatique de données regroupant les intensités de toutes les caractéristiques détectées, c'est-à-dire les couples rapport masse sur charge / temps de rétention. Un exemple de stratégie de méthode de retraitement des données et d'identification des variables discriminantes est présenté dans la partie expérimentale.

Une fois les données extraites et la matrice constituée, l'identification des variables, discriminantes ou non, peut être réalisée selon différentes méthodes comme l'utilisation de bases de données propres à un laboratoire ou publiques telles que LipidMaps® ou Metlin®. L'identification des lipides représente une étape cruciale dans l'analyse lipidomique car elle conditionne l'interprétation biologique en aval. Elle nécessite généralement le recours à la spectrométrie de masse en tandem afin d'élucider complètement la structure d'un composé lipidique, par étude des fragments caractéristiques.

2.5.3. Analyse lipidomique et sécheresse oculaire

Actuellement, peu d'analyses lipidomiques ont été consacrées à la sécheresse oculaire. Les quelques études publiées se sont focalisées sur l'étude des lipides du film lacrymal. En effet, les sécheresses oculaires par excès d'évaporation ont une forte prévalence dans les populations atteintes de SO et sont majoritairement liées à un dysfonctionnement des glandes de meibomius [2,5]. Ainsi, la caractérisation de la composition lipidique des larmes et du meibum de patients a permis de mettre en évidence qu'une très grande quantité d'espèces

lipidiques y sont présentes. Les esters d'acides gras et le cholestérol sont les sous-classes les plus représentées ; elles permettent la cohésion de la phase lipidique du film lacrymal évitant ainsi l'évaporation de la couche aqueuse. Chez les patients atteints de sécheresse oculaire, une diminution du taux d'esters de cires est observée et corrèle avec les paramètres cliniques de sévérité de la maladie [108].

Cependant, peu d'études se sont intéressées aux rôles des lipides des cellules de la surface oculaire, les cellules cornéennes et conjonctivales, qui jouent un rôle de défense contre les agressions extérieures et qui sont en première ligne lorsque le film lacrymal est altéré. De plus, les lipides cellulaires jouent un rôle majeur dans les processus de recrutement de cellules inflammatoires mais également dans la mort cellulaire, deux phénomènes clefs dans la physiopathologie de la sécheresse oculaire. Ainsi, il semble important de comprendre comment les lipides des cellules de la surface oculaire sont modifiés au cours de la SO. Pour cela, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de sécheresse oculaire, la lignée de cellules épithéliales humaines cornéennes HCE-T exposées au BAK, principal conservateur des collyres ophtalmologique, ou à l'hyperosmolarité, trait physiopathologique central de la SO. Les résultats de cette analyse sont présentés dans la partie expérimentale.

Expérimentation

3. Matériels et Méthodes

3.1. Culture cellulaire

La lignée de cellules humaines épithéliales de la cornée immortalisée par SV-40 (HCE-T, Rikken Bioressource, Japon) a été utilisée pour réaliser l'étude [109]. Les cellules ont été cultivées dans un milieu de culture DMEM/F12 (Gibco®, Paisley, UK) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco®, Paisley, UK), 2 mM de glutamine (Gibco®, Paisley, UK), 100 UI/mL de Pénicilline et 100 µg/mL de Streptomycine (Gibco®, Grand Island, USA). Les cellules ont été entretenues une fois par semaine par décollement enzymatique avec une solution de trypsine 0,05% - EDTA (Gibco®, Paisley, UK).

3.2. Solutions d'exposition

Une solution mère de chlorure de benzalkonium (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) à 0,1% (m/v), correspondant à 2,65 mM, a été utilisée pour réaliser toutes les expériences. Les solutions hyperosmolaires ont été réalisées après dilution à partir d'une solution mère de 1000 mOsM en surchargeant du milieu de culture avec du chlorure de sodium (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Une mesure d'osmolarité a été réalisée pour chaque solution à partir d'un osmomètre (Roebing 13DR, Berlin, Allemagne).

3.3. Immunomarquage par immunofluorescence indirecte

Les cellules ont étéensemencées sur des lamelles de 20 mm autoclavées et placées dans des plaques 12 puits à une densité de 100 000 cellules/mL. Après exposition pendant 24 heures, les cellules sont lavées au PBS (Gibco®, Paysley, UK) puis fixées par une solution de paraformaldéhyde à 4% pendant 15 minutes. Les cellules sont ensuite perméabilisées et saturées avec une solution contenant du Triton-X® à 0,3% et du sérum de cheval à 5% pendant 20 minutes. Après lavage au PBS, les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire pendant 1 heure à température ambiante, puis avec l'anticorps secondaire (AlexaFluor® 488 ou 588) pendant 30 minutes. Les noyaux cellulaires sont marqués au 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Après lavage, les lamelles sont montées sur lame avec un liquide de montage Fluoromount® (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France).

Tableau 2 : Références des anticorps utilisés

Anticorps	Hôte	Dilution	Références
P38-Totale	Lapin	1/50	Cell Signaling® - 9212
Phospho-P38	Lapin	1/1600	Cell Signaling® – 4511
P42/44 Totale	Lapin	1/250	Cell Signaling® – 9101
Phospho-P42/44	Souris	1/50	Cell Signaling® – 4696
Caspase 3 Clivée	Lapin	1/400	Cell Signaling® – 9661

3.4. Test de cytotoxicité

3.4.1. Test de viabilité au Rouge Neutre

Le rouge neutre est un colorant vital qui s'accumule dans les lysosomes des cellules viables [110]. Ce colorant traverse la membrane plasmique par voie passive et s'accumule ensuite dans les lysosomes. Après incorporation du rouge neutre dans les lysosomes, celui-ci est piégé si les cellules sont intactes. Pour réaliser cet essai, une solution mère à 0,4% est préparée en dissolvant 40 mg de Rouge Neutre (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) dans 10 mL d'eau stérile. Le jour de l'expérience, une solution-fille diluée au 80^{ème}, est préparée dans du milieu de culture seul. La solution ainsi préparée est centrifugée à 3500 rpm pendant 10 minutes. Les cellules HCE-T sontensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 20 000 cellules par puits. Après 24 heures d'adhérence, les cellules sont exposées pendant 24 heures puis rincées par 200 µL de PBS. La coloration se réalise en distribuant la solution fille de rouge neutre à raison de 200 µL par puits. Les plaques sont incubées pendant 3 heures à 37°C à l'abri de la lumière, puis un rinçage au PBS est effectué. Les cellules sont ensuite lysées par une solution d'acide acétique (1%, v/v) et d'éthanol (49,5%, v/v) puis homogénéisées pendant 15 minutes sur plaque agitatrice à température ambiante. L'intensité de la fluorescence est mesurée à partir d'un spectrofluoromètre (TECAN, Neuville-Sur-Oise, France) à une longueur d'onde d'excitation de 540 nm et une longueur d'onde d'émission de 600 nm.

3.4.2. Production d'espèces réactives de l'oxygène via la sonde H₂DCFDA

Le diacétate de dichlorodihydrofluorescéine 2',7' ou H₂DCFDA est une forme chimiquement réduite de la fluorescéine. Cette sonde fluorogène traverse la membrane cellulaire par diffusion passive et s'accumule dans le cytosol où elle est hydrolysée par les estérases cellulaires en 2',7'-dihydrochlorofluorescéine. Cette molécule peut être alors oxydée par les espèces réactives de l'oxygène (ERO), plus spécifiquement par le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, formant ainsi un dérivé fluorescent, la 2',7'-dichlorofluorescéine. L'intensité de fluorescence mesurée est donc proportionnelle à la concentration en ERO présente dans la cellule et est corrélée au stress oxydant. La solution d'H₂DCFDA est fournie dans du DMSO à une concentration de 0,1 M (Thermo Fisher Scientific, Saint-Quentin-Fallavier, France). Une solution fille à 20 µM est préparée dans du PBS. Après ensemencement à raison de 20 000 cellules par puits, les cellules sont traitées pendant 24 heures puis rincées. Un volume de 200 µL de la solution fille d'H₂DCFDA est distribué dans chaque puits. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, l'intensité de la fluorescence est mesurée à partir d'un spectrofluoromètre à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et une longueur d'onde d'émission de 535 nm (TECAN, Neuville-Sur-Oise, France).

3.5. Analyse lipidomique

3.5.1. Préparation des échantillons et extraction des lipides

Vingt-quatre heures après ensemencement dans un milieu de culture contenant 10% de SVF, les cellules sont incubées en présence de BAK ou de solutions hyperosmolaires (HO) dans un milieu contenant 2% de SVF. Après 24 heures d'exposition, les cellules sont détachées rapidement par action enzymatique de la trypsine. Après centrifugation à 2000 rpm pendant 10 minutes, les cellules sont rincées avec du PBS puis conservées à -80°C.

Le jour de l'extraction, les culots cellulaires contenant 3 millions de cellules sont mis en suspension dans 1 mL d'eau. Une lyse cellulaire est réalisée par choc osmotique puis traitement par les ultrasons à 4°C pendant 5 minutes. Un volume de 15 µL d'une solution contenant un étalon interne représentatif de chaque sous-classe de lipides est ajouté à la suspension cellulaire. Une extraction liquide/liquide est ensuite réalisée en ajoutant 3,75 mL d'un mélange de chloroforme et de méthanol (1/2 ; v/v) contenant 0,01 % de 3,5-di-tert-4-

butylhydroxytoluène (BHT). Le BHT, ajouté à tous les solvants d'extraction, est utilisé afin de limiter l'oxydation des lipides durant l'extraction. Les échantillons sont alors agités par retournement pendant 20 minutes à température ambiante. Un volume de 1,25 mL de chloroforme est ajouté, les échantillons sont agités pendant 30 secondes puis un volume de 1,25 mL d'eau est additionné. Les échantillons sont à nouveau agités par retournement pendant 10 minutes à température ambiante. Une centrifugation est réalisée pendant 10 minutes à 2500 rpm afin de parfaire la séparation entre phases aqueuse et organique. Un volume de 2 mL de phase organique contenant les lipides extraits est alors prélevé puis évaporé de ses solvants à 45°C sous pression réduite (SpeedVac®, Thermo Fisher Scientific, Saint-Quentin-Fallavier, France). Les résidus secs sont repris dans 300 µL de chloroforme puis évaporés à nouveau. Enfin, les extraits lipidiques sont repris dans 100 µL d'un solvant composé d'un mélange acétonitrile/isopropanol/chloroforme/eau (35/35/20/10 ; v/v/v/v) avant injection dans le système de chromatographie liquide ultra performante couplé à la spectrométrie de masse haute résolution (UPLC-HRMS-ESI+/-).

3.5.2. Analyse lipidomique globale

3.5.2.1. Analyse UPLC-HRMS-ESI+/-

Afin de valider l'analyse d'un point de vue analytique, un échantillon de contrôle qualité (QC 1/1) est préparé par mélange équivolumétrique de chaque échantillon lipidique extrait [104,105]. Une partie du QC 1/1 est diluée au 1/3 et au 1/6 permettant l'obtention d'un QC 1/3 et d'un QC 1/6. Les échantillons sont injectés de façon orthogonalisés afin de prévenir les biais d'analyse liés à d'éventuelles dégradations compte tenu de la durée de l'analyse (36 heures). En plus des échantillons lipidiques extraits et des QCs, un mélange standard de 48 lipides est injecté régulièrement au cours de l'analyse. Ce mélange contient des lipides des principales classes et sous-classes lipidiques. Il permet de valider la stabilité analytique du spectromètre de masse en évaluant l'exactitude de la mesure de masse ainsi que la séparation chromatographique par comparaison des temps de rétention des standards lipidiques avec les données préalablement acquises.

3.5.2.2. Conditions analytiques

La chromatographie liquide à polarité de phase inversée est réalisée sur un système UPLC Acquity® Waters® (Manchester, UK) en utilisant une colonne CSH® C18 (100 x 2,1 mm,

1,7 μm). La séparation chromatographique est réalisée en gradient de solvants. La phase mobile est constituée par un mélange de 2 solvants : eau/acétonitrile (60/40) et isopropanol/acétonitrile (90/10) contenant chacun un tampon d'acétate d'ammonium à 10 mM. Le débit est de 0,4 mL/min, la température de la colonne est maintenue à 50°C et la durée totale de l'analyse est de 15 minutes. Les données sont collectées sur un spectromètre de masse SYNAPT® G2 High Definition Mass Spectrometry® Waters® (Manchester, UK) utilisant l'électronébulisation en mode positif (ESI+) et en mode négatif (ESI-) comme méthode d'ionisation. Les paramètres de la source d'ionisation sont les suivants : tension de cône de 30 V pour l'ESI + et de 45 V pour l'ESI -, température de source de 120 °C, température de désolvatation de 550 °C et débit du gaz de désolvatation de 900 L/h. La durée de balayage est de 0,1 seconde et la résolution est de 21 500 (FWHM). Les spectres de masse sont acquis en mode centroïde dans un intervalle de masse compris entre m/z 50 et 1200. La leucine enképhaline (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) est utilisée comme étalon externe (LockSpray®) afin de corriger la mesure de masse durant l'acquisition.

3.5.2.3. Prétraitement des données

A partir des données UPLC-HRMS-ESI+/-, une extraction des données sous forme de variables est effectuée à l'aide du script MassWolf et du logiciel XCMS. Chaque variable est caractérisée par un temps de rétention (t_R), un rapport masse sur nombre de charge (m/z) et une intensité. L'ensemble des variables est organisé en une matrice de données où les intensités des pics sont associées à une unique valeur m/z et t_R pour chaque échantillon. Les intensités de chaque variable sont ensuite normalisées par rapport à l'intensité totale. Une fois normalisées, les variables sont filtrées selon le coefficient de corrélation. Seules les variables dont l'intensité est corrélée de façon suffisante entre les QC 1/1, 1/3 et 1/6 sont conservées, le seuil étant fixé à 0,7. Une seconde filtration est effectuée selon le coefficient de variation (CV) calculé pour chaque valeur à partir des intensités des QCs 1/1. Seules les variables ayant un CV inférieur à 20% sont conservées.

3.5.2.4. Analyses statistiques multivariées

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel SIMCA-P+ (Umetrics, Aubagne, France). Plusieurs analyses statistiques multivariées (ASM) ont été réalisées dans le but de rechercher d'éventuelles corrélations entre des données spectrales (rapport m/z , temps de

rétenion, intensité) et des données biologiques (conditions d'exposition). Tout d'abord, nous avons réalisé une ASM non supervisée, l'analyse en composante principale (PCA), sans indication *a priori* sur l'appartenance de chaque échantillon à un groupe, afin de mettre en évidence la distribution des variables selon la plus grande variance. Ensuite, nous avons utilisé deux types d'ASM supervisées : l'analyse discriminante par les moindres carrés partiels (PLS-DA) et l'analyse discriminante par les moindres carrés partiels orthogonales (OPLS-DA). La PLS-DA est dite supervisée car un facteur explicatif à l'origine de la séparation des variances est introduit, c'est-à-dire que l'appartenance de chaque échantillon à un groupe est indiquée *a priori*. L'objectif reste le même que celui de la PCA.

L'OPLS-DA est également une analyse supervisée où l'appartenance de chaque échantillon à un groupe est indiquée mais elle se distingue de la PLS-DA par la séparation de la matrice de données spectrales en deux groupes : un premier correspondant aux variables corrélées à un descripteur de la matrice de données biologiques et un second correspondant aux variables non corrélées à un descripteur de cette même matrice. Ainsi, l'analyse OPLS-DA permet de séparer les variables prédictives de celles qui ne le sont pas et modélise uniquement les variables à l'origine d'une séparation.

Le profil lipidique global entre les cellules HCE-T exposées et non exposées est donc comparé en utilisant une analyse PCA, une analyse PLS-DA et une analyse OPLS-DA après transformation de Pareto des données. Une validation croisée de l'analyse des variances (CV-ANOVA) est réalisée pour chaque analyse supervisée avec un risque alpha fixé à 0,05. Un essai de permutation est également réalisé pour chaque analyse statistique multivariée supervisée. A partir du modèle OPLS-DA, une modélisation S-Plot est générée.

3.5.2.5. Annotation des lipides discriminants

Les lipides dont le taux est modifié ont été annotés à partir de la base de données LipidMaps® et Metlin® à partir du rapport m/z . Les lipides peuvent être annotés sous forme d'ions $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$ mais également sous forme d'adduits ioniques (sodium, potassium, ammonium). Les variables redondantes ont été exclues. La tolérance de différence de masse a été fixée à 5 ppm. L'annotation est également fondée sur le temps de rétention de chaque composé. Des lipides de référence ont été injectés plusieurs fois au cours de l'analyse permettant ainsi de connaître le temps de rétention pour un lipide connu. Une relation

linéaire existe entre le nombre de carbones équivalent (ECN) et le temps de rétention pour chaque sous-classe de lipides. Un seuil de différence entre le temps de rétention théorique et expérimental a été fixé à 15% pour confirmer l'annotation.

3.5.2.6. Analyses statistiques univariées

Pour chaque lipide annoté, un test de Student est réalisé afin de comparer les moyennes des groupes exposés et non exposés. Le taux de fausses découvertes (False Discovery Rate, FDR) est réalisé en *post hoc* avec un risque alpha fixé à 0,01. Ce test a pour objectif d'évaluer les faux positifs compte tenu du risque alpha fixé pour le test de Student à 0,05.

3.5.3. Analyse lipidomique ciblée : quantification des stérols

Les culots cellulaires contenant 3 millions de cellules ont été récupérés comme décrit dans la partie 3.5.1 (Matériels et Méthodes). Le dosage des stérols est également réalisé par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse [111]. Brièvement, le culot cellulaire est suspendu dans 600 μL d'eau, agité pendant 30 secondes puis plongé dans un bain à ultrasons à 4°C pendant 5 minutes. Tous les solvants d'extraction sont additionnés de 0,01% de BHT afin de prévenir l'oxydation. Les stérols sont extraits par une extraction liquide/liquide par un mélange d'hexane et de méthanol (7/1 ; v/v) sous agitation pendant 40 minutes puis évaporés à 45°C sous pression réduite. Une dérivation des stérols est réalisée en reprenant le résidu sec obtenu par un volume de 200 μL d'une solution de dichlorométhane contenant du 4-(diméthyl-amino)phényl isocyanate (DMAPI). Un volume de 30 μL de triéthylamine est également ajouté. En présence de triéthylamine, le DMAPI réagit avec la fonction hydroxyle ou la fonction carbonyle des stérols pour former un carbamate stable. La réaction est effectuée à 65 °C pendant 2 heures. Un volume de 150 μL de tampon phosphate est ajouté pour interrompre la réaction suivie d'un volume de 3 mL d'hexane. Une centrifugation à 2500 rpm est effectuée pendant 10 minutes. La phase organique contenant les stérols dérivés est prélevée et évaporée à 45°C sous pression réduite. Enfin, les résidus secs sont repris dans un volume de 100 μL d'un mélange d'acétonitrile et d'isopropanol (1/1 ; v/v) puis injecté dans le système UPLC-HRMS-ESI+/-.

3.6. Analyse d'expression génique

3.6.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux (ARNt) ont été extraits à partir du kit Nucleospin® (Macherey Nagel, Neumann-Neander, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, le culot cellulaire conservé à -80°C est repris dans un volume de 350 µL de tampon de lyse contenant du tris(2-carboxyethyl)phosphine. Après homogénéisation du lysat, une filtration est effectuée par centrifugation à 11 000 rpm pendant 1 minute. Un volume de 350 µL d'éthanol 70% est ajouté afin de charger les acides nucléiques et de permettre leur adsorption. Après homogénéisation, le lysat est déposé sur une colonne de silice permettant de retenir les acides nucléiques. Une centrifugation est réalisée à 11 000 rpm pendant 30 secondes. Un volume de 350 µL d'un tampon permettant d'éliminer les sels présents sur la colonne est ajouté puis une centrifugation est effectuée à 11 000 rpm pendant 1 minute. Un volume de 95 µL d'une solution de rDNase digérant l'ADN est ajouté au centre de la membrane de silice. Une incubation à température ambiante pendant 15 minutes est alors réalisée. Après l'incubation, 3 lavages successifs sont réalisés à l'aide de tampon de lavage. L'élution des ARNt est effectuée par un volume de 60 µL d'H₂O sans RNase. Les concentrations en ARNs sont déterminées par un spectrophotomètre Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, Saint-Quentin-Fallavier, France). Les ARN extraits sont conservés à -80°C.

3.6.2. Transcription inverse (Reverse transcription)

La synthèse des brins d'ADN complémentaire (ADNc) est réalisée à partir d'une quantité identique d'ARN pour chaque condition d'exposition (600 ng) à l'aide du kit *High Capacity cDNA Reverse transcription* (Applied Biosystem). La réaction de rétro transcription est réalisée à partir d'un mélange réactionnel contenant 1 µL de *reverse transcriptase*, 2 µL de *RT random primers*, 0,8 µL d'une solution contenant les désoxyribonucléotides, 10 µL d'un tampon et 14,2 µL contenant 600 ng d'ARN. Cette réaction est réalisée sur un thermocycleur (Applied Biosystem) selon les conditions suivantes : (1) 25°C pendant 20 minutes, (2) 37°C pendant 2 heures, (3) 85°C pendant 5 minutes. Les échantillons sont immédiatement conservés à -20°C jusqu'à une utilisation ultérieure.

3.6.3. qPCR

La concentration en ADNc est de 5 ng/ μ L. Le mélange réactionnel ajouté dans chaque puits est composé de 10 μ L de *Master Mix*[®], 0,7 μ L de sondes TaqMan[®] et 4,3 μ L d'H₂O. Les sondes TaqMan utilisées sont les suivantes : *HPRT* : Hs02800695_m1, *IL-1B* : Hs015554136_m1, *IL-6* : Hs00174131_m1, *CCL2* : Hs00234140_m1, *NOX1* : Hs01071088_m1, *CERS2* : Hs00371958_g1, *ASAH2* : Hs01015655_m1, *DGAT1* : Hs01020362_g1, *PLA1A* : Hs01056915_m1, *SMPD2* : Hs00906924_g1. Le gène codant pour *HPRT* est utilisé comme gène de ménage. Un volume de 5 μ L de chaque échantillon et 15 μ L de mélange réactionnel sont placés dans une plaque 96 puits. La PCR est réalisée à l'aide d'un thermocycleur 7300 (Applied Biosystem[®]). La réaction enzymatique comprend une étape initiale à 50°C pendant 2 minutes, suivie de 40 cycles se composant d'une étape à 95°C pendant 15 secondes, une étape à 60°C pendant 1 minute. La quantification est réalisée par la méthode du $\Delta\Delta$ Ct. Un Δ Ct_{Echantillon} est calculé selon la formule Δ Ct_{Echantillon} = Ct_{Gène cible} - Ct_{Contrôle endogène}. $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct_{Echantillon exposé} - Δ Ct_{calibrateur}. Le contrôle endogène correspond à l'*HPRT* et le calibrateur est un contrôle non exposé pour chaque gène. La quantification relative RQ est obtenue de la façon suivante : $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. RQ correspond à un ratio représentant l'expression du gène cible dans l'échantillon exposé par rapport à son expression dans le calibrateur.

3.7. Coloration des triglycérides

Les cellules ont étéensemencées sur lamelles à une densité de 100 000 cellules/mL. Après exposition, les cellules sont lavées au PBS puis fixées par une solution de paraformaldéhyde à 4%.

3.7.1. Coloration à l'huile rouge

Trois volumes d'une solution commerciale glycérolée contenant 0,5% d'huile rouge (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) sont mélangés à 2 volumes d'eau. Un volume de 100 μ L de la solution est ajouté dans chaque puits. Après 30 minutes d'incubation, les cellules sont lavées au PBS pendant 5 minutes à 3 reprises. Les lamelles sont montées sur lame dans un milieu de montage composé de glycérol puis sont observées en microscopie à fluorescence.

3.7.2. Coloration au Rouge Nil

Une solution de Rouge Nil (Thermo Fisher Scientific, Saint-Quentin-Fallavier, France) est diluée au 1000^{ème} dans un liquide de montage composé de glycérol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Les lamelles sont directement montées sur lame. L'observation est réalisée en microscopie à fluorescence.

3.8. Analyses statistiques

Chaque expérimentation est réalisée au minimum à trois reprises indépendantes. En fonction des expérimentations, deux à six réplicas techniques ont été réalisés par réplicas biologiques. Les résultats sont présentés en pourcentage par rapport au contrôle et correspondent aux moyennes avec une barre d'erreur représentant l'écart type. Les analyses statistiques ont été réalisées à partir du logiciel GraphPad Prism 7 (GraphPad, GraphPad Software, La Jolla, CA). Après vérification de la normalité par un test d'Agostino-Pearson, la comparaison des moyennes de plus de 2 groupes est réalisée à partir d'un test ANOVA suivi d'un test post-hoc de Dunnet de comparaison multiple avec un risque α fixé à 0,05. Les comparaisons de deux moyennes ont été réalisées à partir d'un test de Student après vérification de la normalité. Les seuils de significativités comparés au contrôle sont les suivants : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

4. Résultats

Afin de déterminer la valeur hyperosmolaire (HO) et la concentration en BAK qui seront utilisées lors de l'analyse lipidomique, des tests de viabilité et de cytotoxicité ont été réalisés.

4.1. Test de viabilité au Rouge Neutre

Les résultats montrent une diminution de la viabilité dépendante de la concentration lors de l'exposition des cellules au BAK ou à l'hyperosmolarité (**Figure 22**). Une concentration en BAK de 6.10^{-5} % diminue la viabilité cellulaire d'environ 30% par rapport au contrôle ($p < 0,0001$). Globalement, une exposition à des concentrations inférieures ou égales à 10^{-4} % en BAK conduit à une viabilité d'environ 60%. Après exposition à une osmolarité de 500 mOsM une diminution d'environ 40% de la viabilité est observée.

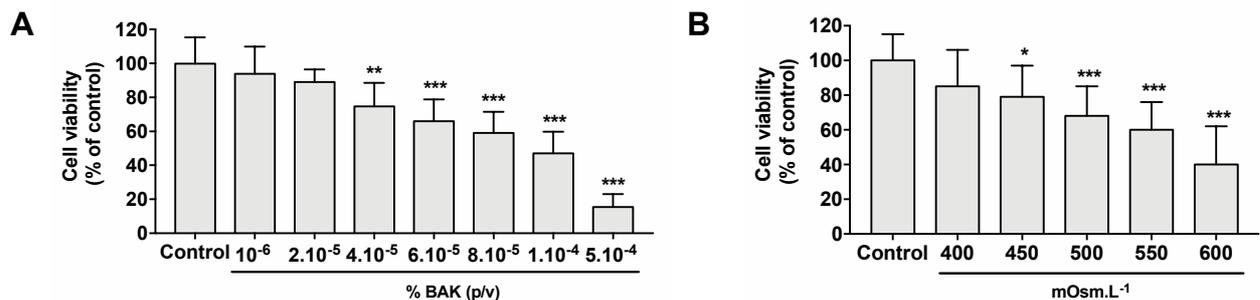


Figure 22 : Viabilité cellulaire après exposition au BAK (A) ou à l'hyperosmolarité (B) pendant 24 heures évaluée à partir de test au rouge neutre. Le contrôle négatif correspond au milieu de culture. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes +/- l'écart type (n = 6).

Une diminution d'environ 40% de la viabilité cellulaire est un indicateur de cytotoxicité admis en toxicologie (ISO 10993-5). Pour les études de l'expression génique et protéique de médiateurs inflammatoires, les concentrations en BAK de 6.10^{-5} % et 10^{-4} % ainsi que les valeurs osmolaires de 400 et 500 mOsM ont été utilisées pour évaluer l'effet dose-réponse. Pour les résultats de l'analyse lipidomique globale et ciblée, seule la concentration en BAK de 10^{-4} % et la valeur osmolaire de 500 mOsM seront présentées.

4.2. Production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) via la sonde H₂DCFDA

Afin d'évaluer si les ERO contribuent au phénomène de cytotoxicité observé par l'essai au rouge neutre, des essais utilisant la sonde H₂DCFDA ont été réalisés (**Figure 23**). Les résultats montrent que les ERO sont augmentées lors de l'exposition pendant 24 heures à des concentrations en BAK supérieures à 4.10⁻⁵ % (p < 0,01). Après exposition à l'hyperosmolarité, une augmentation des ERO est observée après exposition à des concentration supérieures à 550 mOsm (p < 0,0001).

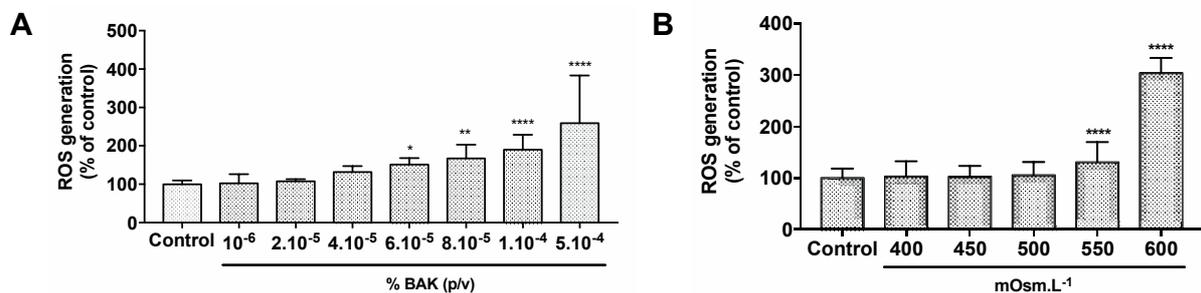


Figure 23 : Evaluation de la production d'espèces réactives de l'oxygène après exposition pendant 24 heures au BAK (A) ou à l'hyperosmolarité (B) à partir de la sonde H₂DCFDA. Le contrôle négatif correspond au milieu de culture. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes +/- l'écart type (n = 6).

4.3. Analyse de l'expression de médiateurs inflammatoires

La sécheresse oculaire s'accompagne d'un phénomène inflammatoire caractérisé par une surproduction de cytokines pro inflammatoires. Par conséquent, l'expression génique de certains de ces médiateurs inflammatoires a été évaluée par RT-qPCR.

Une augmentation de l'expression génique de *IL1B* et de *IL6* est observée de façon dépendante de la concentration de BAK (p < 0,05). En revanche, aucune augmentation de l'expression génique du *CCL2* n'a été mise en évidence après exposition aux concentrations en BAK utilisées (**Figure 24 A**).

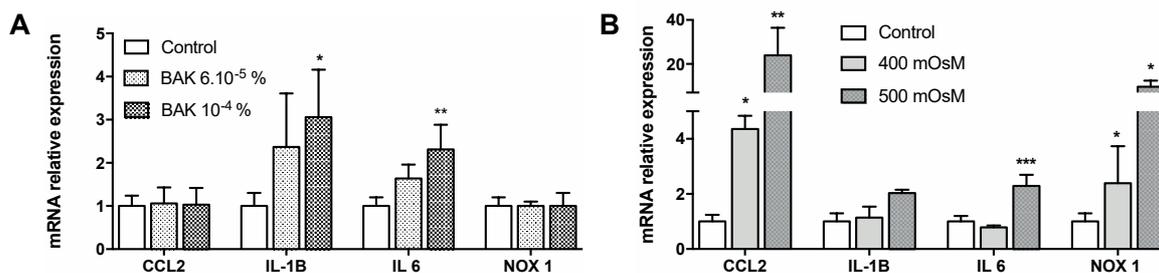


Figure 24 : Expression des médiateurs de l’inflammation après exposition au BAK (A) ou à l’hyperosmolarité (B). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm l’écart type (n = 5).

Une augmentation significative de l’expression génique de *CCL2* et de *NOX1* ($p < 0,05$) après exposition à l’hyperosmolarité a été observée ainsi qu’une augmentation de l’expression génique de l’IL6 pour une osmolarité de 500 mOsM ($p < 0,001$) (**Figure 24 B**).

4.4. Expression de protéines impliquées dans l’inflammation et l’apoptose

La sécheresse oculaire s’accompagne de processus de mort cellulaire et d’inflammation. Ces processus incluent des médiateurs moléculaires, notamment une augmentation des Caspases 3 clivées et des formes actives des MAPK. Afin d’évaluer l’expression protéique de ces médiateurs inflammatoires et apoptotiques, des immunomarquages ont été réalisés après exposition au BAK ou à l’hyperosmolarité.

L’exposition au BAK engendre une augmentation dépendante de la concentration de la caspase 3 clivée (**Figure 25**). La forme totale de p42/44 n’est pas augmentée, montrant une expression constante avec ou sans exposition au BAK. La forme phosphorylée de p42/44, représentant la forme activée, a une intensité augmentée par rapport au contrôle. Pour la protéine p38 de la voie des MAPK, une légère augmentation de la forme phosphorylée est également observée pour l’exposition au BAK 10⁻⁴ %. Néanmoins, aucune méthode quantitative n’a été réalisée et les observations susmentionnées sont uniquement basées sur l’évaluation visuelle des observations faites en microscopie à fluorescence.

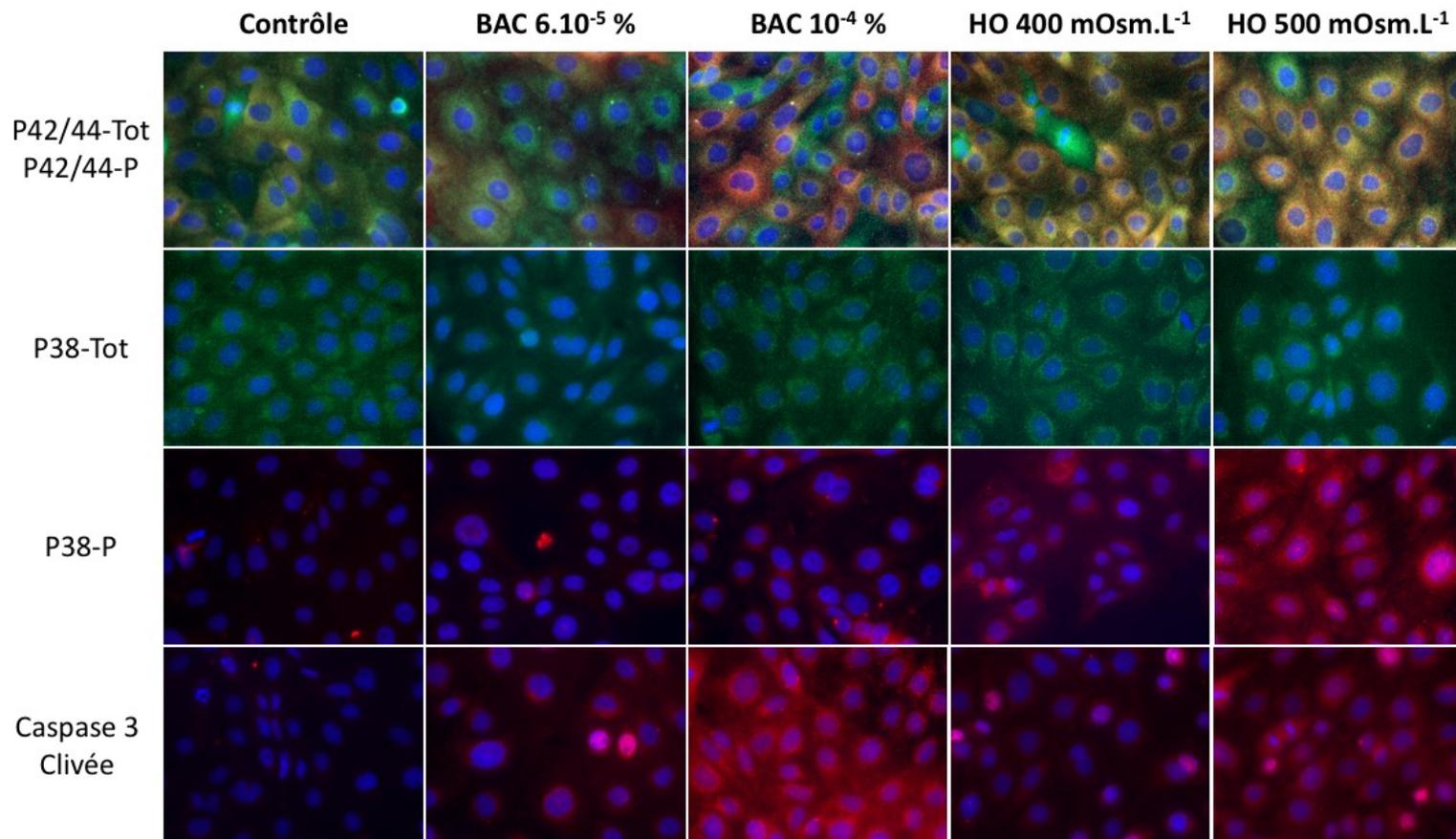


Figure 25 : Immunocytochimie après exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité. Le marquage de la protéine p42/44 totale est représenté en vert et sa forme phosphorylée en rouge. L'exposition au BAK 10^{-4} % engendre une augmentation de la forme phosphorylée de p42/44, une légère augmentation de la forme phosphorylée de p38 et une augmentation de la forme clivée des Caspases 3. L'exposition à une osmolarité de 500 mOsM engendre une augmentation de la forme phosphorylée de p42/44, de la forme phosphorylée de p38 et de la forme clivée des Caspases 3. L'expression de la forme totale de p38 et p42 a été évaluée pour chaque condition d'exposition et n'est pas modulée. Les noyaux ont été marqués au DAPI, représenté en bleus. Grossissement x 400.

L'exposition à l'hyperosmolarité engendre une augmentation de la caspase 3 clivée (**Figure 25**). Cependant, l'intensité de la fluorescence semble moins importante que lors de l'exposition au BAK 10^{-4} %. Une légère augmentation de la forme phosphorylée de p42 est observée pour une exposition osmolaire de 500 mOsM. Une augmentation de l'intensité de la fluorescence est observée pour la forme phosphorylée de p38 à la dose de 500 mOsM indiquant une augmentation par rapport au contrôle.

4.5. Analyse lipidomique globale

Pour étudier l'impact de l'exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité sur la composition en lipides des cellules HCE, nous avons effectué une analyse lipidomique globale par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-MS). Un exemple de chromatogramme en mode d'ionisation positif (ESI+) et négatif (ESI-) d'extraits de lipides cellulaires provenant de cellules HCE-T est présenté sur la Figure 26.

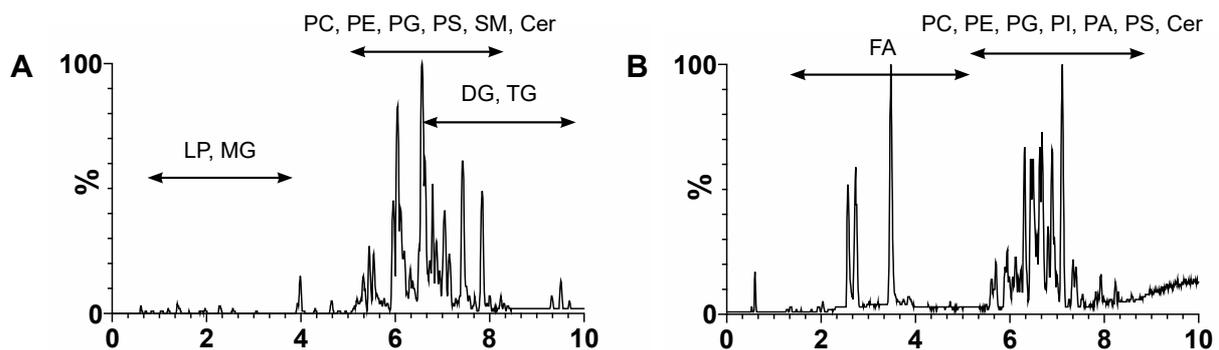


Figure 26 : Chromatogrammes de cellules contrôles obtenus en mode d'ionisation positif (A) et négatif (B). Les lipides sont séparés en fonction de leurs longueurs de chaîne. Les deux modes d'ionisation sont complémentaires, les glycérolipides ne sont ionisés qu'en ESI+ alors que les acides gras qu'en ESI-. Les phospholipides sont ionisés dans les deux polarités d'ionisation mais disposent d'une sensibilité dans chaque polarité différente en fonction des sous-classes.

En mode d'ionisation positif, les lysophospholipides (LP) et les monoacylglycérols (MG), sont élués entre 1,5 et 3 min, les phospholipides (phosphatidylcholine PC, phosphatidyléthanolamine PE, phosphatidylinositols PI, phosphatidylglycérol PG et phosphatidylsérine PS) et les sphingolipides (Sphingomyéline SM et Céramide Cers) sont élués entre 5 et 8 min, les diacylglycérols (DG) entre 6 et 9 min et les triacylglycérols (TG) entre 8 et

11 min. En mode d'ionisation négatif, les AG sont d'abord élués avant 6 min, suivis des Cers et des phospholipides (PE, PI, PG et PS) entre 6 et 9 min.

La validation de l'analyse lipidomique a été effectuée en accord avec les méthodologies préalablement publiées et en accord avec les lignes directrices actuelles [104,105,112]. Afin de valider l'analyse d'un point de vue analytique, des QCs à différentes dilutions (QC 1/1, 1/3 et 1/6), préparés à partir d'un mélange équivolométrique de chaque échantillon, ont été injectés tout au long de la séquence d'analyse et une analyse en composante principale (PCA) a été réalisée sur ces QCs.

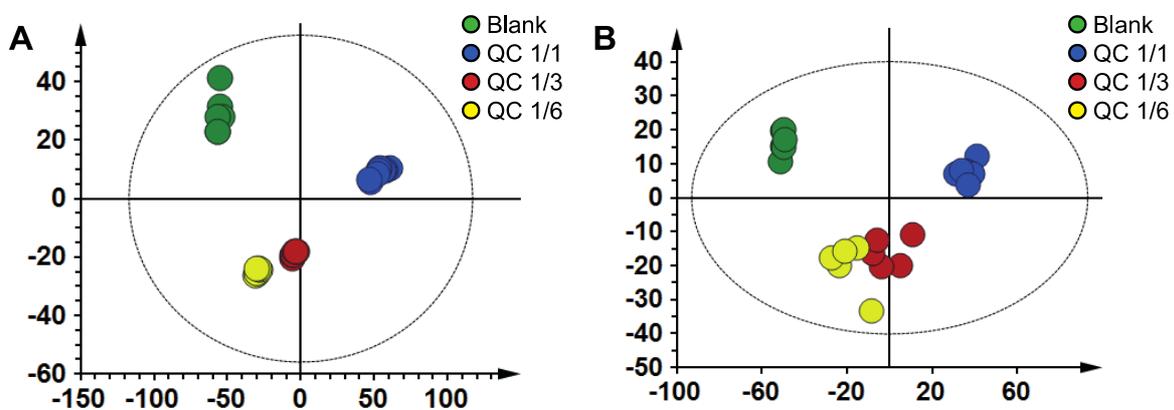


Figure 27 : Représentation graphique du modèle PCA générée à partir des données obtenues en UPLC-HRMS en mode ESI+ (A) et ESI- (B) montrant la séparation des différentes catégories d'échantillons : 1A & 1B - QCs 1/1, 1/3, 1/6 et blancs

La représentation graphique du modèle générée pour l'analyse ESI+ et ESI- montre le regroupement des réplicats de chaque QCs en fonction des trois niveaux de dilution (**Figure 27**). Ainsi, ce résultat valide la qualité des données obtenues en ESI+ et en ESI- et confirme que les différences entre les échantillons biologiques ne sont pas liées à des variations analytiques.

4.5.1. Analyses statistiques multivariées

Une analyse non supervisée (PCA) comparant les cellules exposées au BAK et les cellules « contrôle » a d'abord été effectuée. L'analyse en ESI+ et en ESI- montre deux groupes séparés correspondant aux échantillons *contrôle* et exposés au BAK 10^{-4} %. (**Figure 28 B1 et B3**). Le pourcentage de variables explicatives et prédictives générées présentait une valeur

modérée pour les données acquises en ESI+ ($R^2 = 0,42$, $Q^2 = 0,32$) et une valeur relativement élevée pour les données acquises en ESI- ($R^2 = 0,62$, $Q^2 = 0,52$). Une analyse non supervisée a également été réalisée pour comparer les lipidomes des cellules exposées à l'hyperosmolarité et les cellules *contrôle*. Les analyses non supervisées ont été validées selon la procédure décrite dans la partie matériels et méthodes relative à ce sujet.

4.5.2. Annotation des lipides

4.5.2.1. Exposition au BAK

Pour le BAK, 1200 variables ayant un $p(\text{corr}) > 0,7$ ont été extraites des S-Plot générés à partir des données obtenues en UPLC-MS-ESI+/- (**Figure 28 C1 et C3**). Au total, 102 lipides sont régulés avec 38 lipides dont le taux est augmenté et 64 lipides dont le taux est diminué. Après exposition au BAK, les sphingolipides, classe regroupant les céramides (Cer) et les sphingomyélines (SM) sont augmentés (**Figure 29**). Les phosphatidylcholines (PC) et les phosphatidyléthanolamines (PE), sont diminués au profit de leur forme lysophosphatidique (**Figure 29**). Pour les glycérophospholipides, la forme plasmalogène varie dans le même sens que la forme non plasmalogène. Pour les glycérolipides, seul un triacylglycérol (TG) est augmenté après exposition au BAK tandis que 1 monoacylglycérol (MG) et 11 diacylglycérols (DG) sont diminués (**Figure 29**).

4.5.2.1. Exposition à l'hyperosmolarité

Pour l'hyperosmolarité, 1102 variables ayant un $p\text{-corr} > 0,7$ ont été extraites des S-Plot générés à partir des données obtenues en UPLC-MS-ESI+/- (**Figure 28 C2 et C4**). Au total, 148 lipides sont régulés avec 98 lipides augmentés et 50 diminués après exposition à une osmolarité de 500 mOsm. Les résultats montrent une augmentation de certains sphingolipides, dont 14 Cer et 13 SM régulés (**Figure 29**). Pour les glycérophospholipides, un LPC est diminué, 14 PC sont augmentés, un LPE est diminué et 15 PE sont augmentés. Environ 15 TG sont augmentés sous l'effet de l'hyperosmolarité (**Figure 29**).

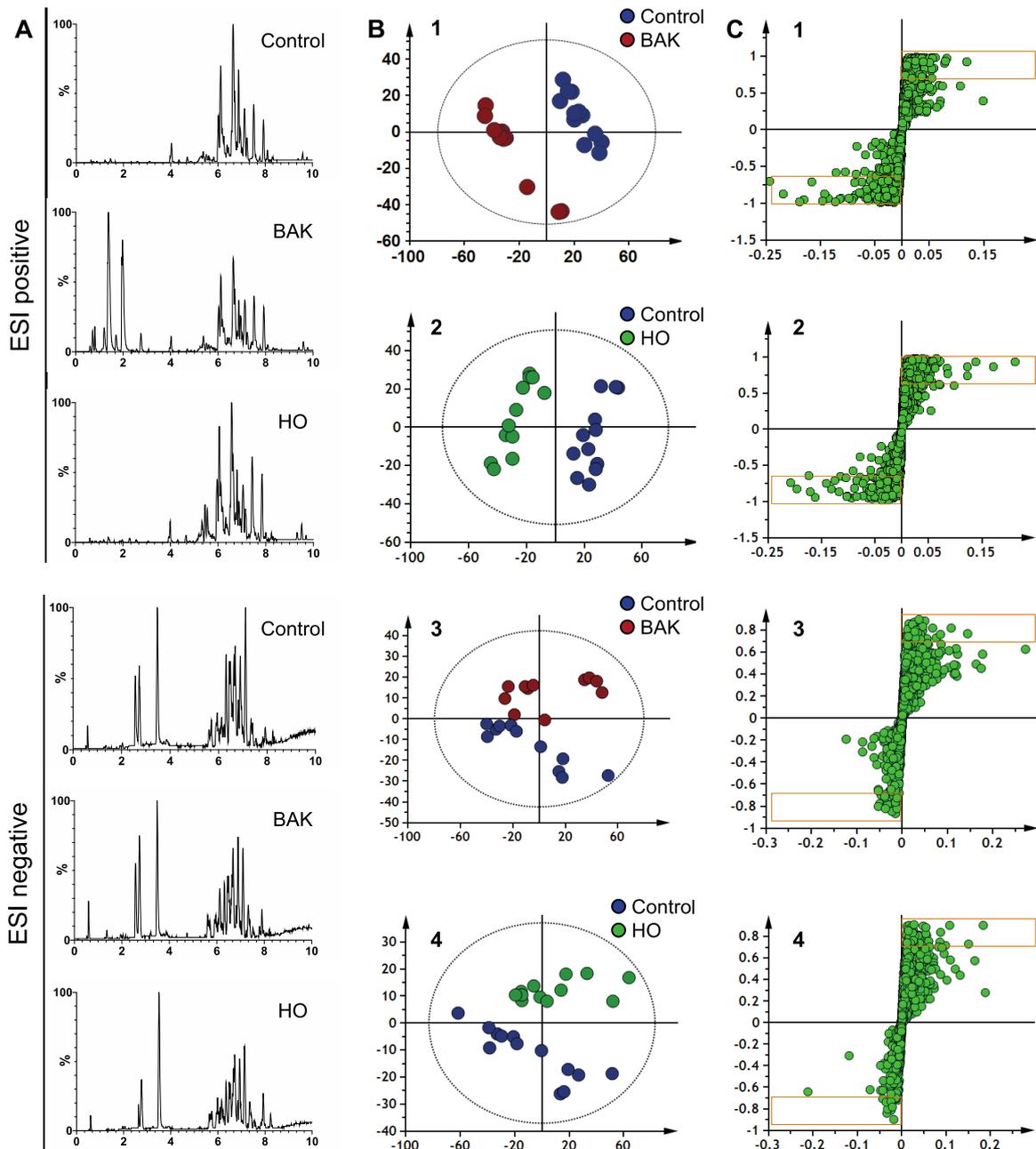


Figure 28 : Résultats de l'analyse lipidomique par UPLC-HRMS-ESI+/- des cellules HCE exposées au BAK ou à l'hyperosmolarité. (A) Chromatogramme des extraits lipidiques des cellules HCE exposées ou non. (B) Représentation graphique des analyses en composantes principales des cellules HCE « contrôle » et exposées. (C) Représentation graphique des « S-Plot » ayant permis la sélection des variables discriminantes soumises au processus d'annotation lipidique.

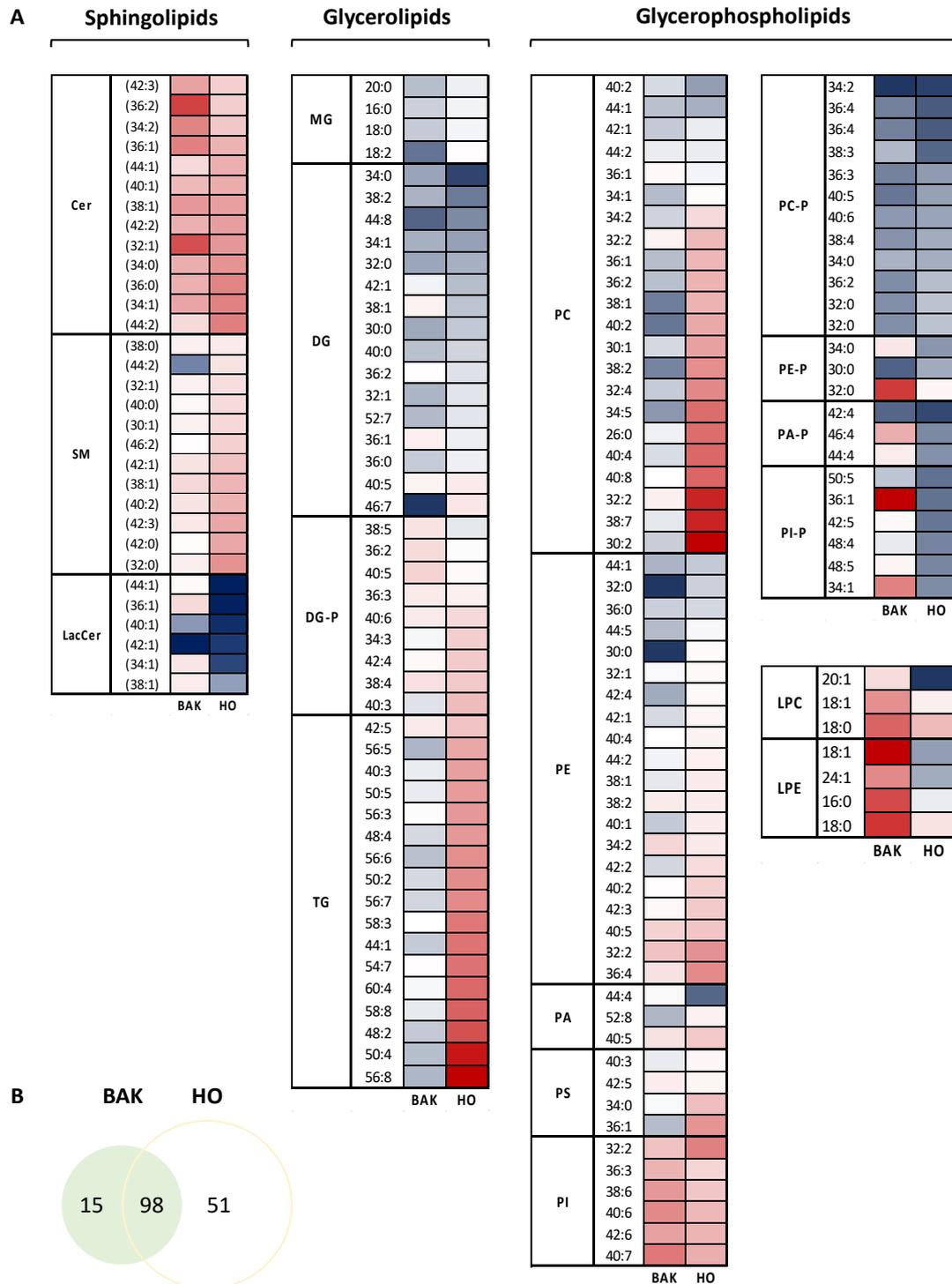


Figure 29 : Représentation « Heat-Map » des lipides dont le taux cellulaire est modifié après exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité. Les résultats sont exprimés sous forme de rapport par rapport au contrôle. La couleur rouge signifie que le taux cellulaire est augmenté après exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité alors que la couleur bleue indique une diminution de ce taux. (B) Diagramme de Venn indiquent les lipides dont le taux est modifié de façon commune au BAK et à l'hyperosmolarité.

4.6. Analyse lipidomique ciblée

4.6.1. Analyse lipidomique ciblée après exposition au BAK

L'exposition des cellules HCE-T au BAK pendant 24 heures conduit à une diminution du taux cellulaire de cholestérol ($p < 0,001$, **Figure 30**) ainsi qu'à une diminution du taux de 7-OH-Cholestérol (7-OH-Cho), de 24-OH-Cholestérol (24-OH-Cho) et de 27-OH-Cholestérol (27-OH-Cho). En revanche, le 7-Kétocholestérol (7-KC) et le 25-OH-Cholestérol (25-OH-Cho) sont augmentés après exposition au BAK 10⁻⁴%.

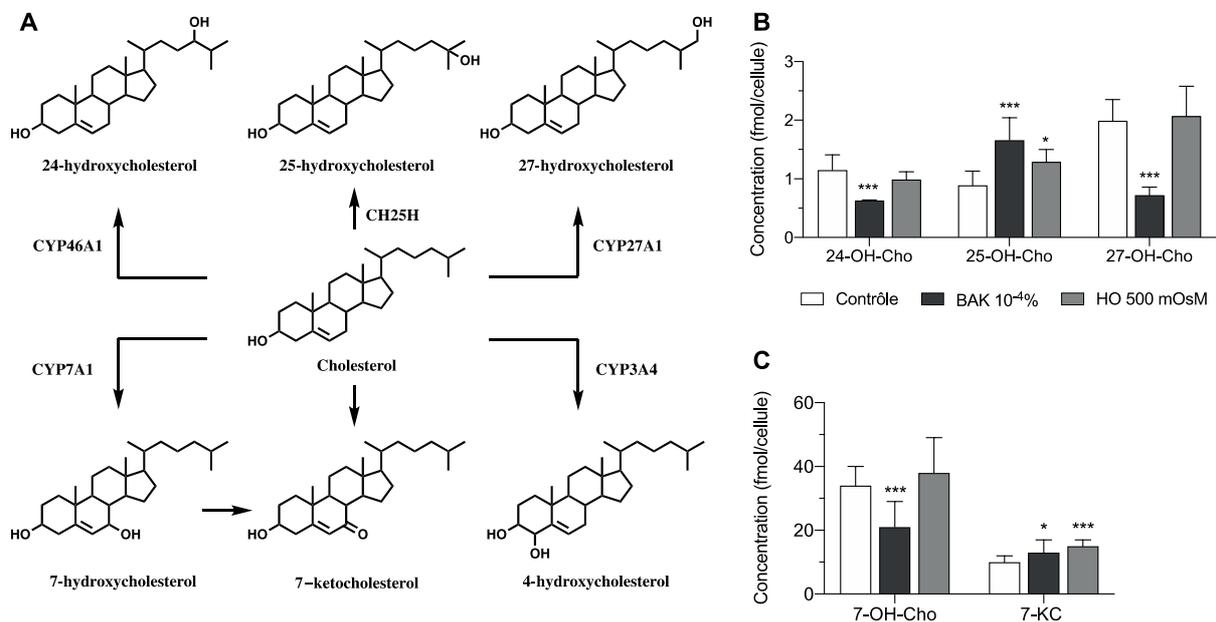


Figure 30 : Altération du métabolisme des oxystérols. (A) Voie de biosynthèse des oxystérols à partir du cholestérol. (B) Changement du taux cellulaire des métabolites oxydés au niveau de la chaîne latérale du cholestérol après exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité. (C) Changement du taux cellulaire des métabolites oxydés au niveau du noyau stérane du cholestérol après exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm l'écart type ($n = 12$).

Afin d'expliquer la diminution du taux de cholestérol après exposition au BAK, un éventuel changement du taux de 7-Déhydrocholestérol (7-DHC) et de desmostérol (Desmo), précurseurs de synthèse de ce stérol, a été recherché *a posteriori* (**Figure 31**). En l'absence d'étalon interne, les résultats sont uniquement présentés sous forme de pourcentage par rapport au contrôle ; aucune concentration absolue n'est présentée. Une augmentation du

taux cellulaire de 7-DHC ($p < 0,001$) et une diminution du taux cellulaire de Desmo ($p < 0,001$) sont observées lors de l'exposition des cellules HCE-T au BAK.

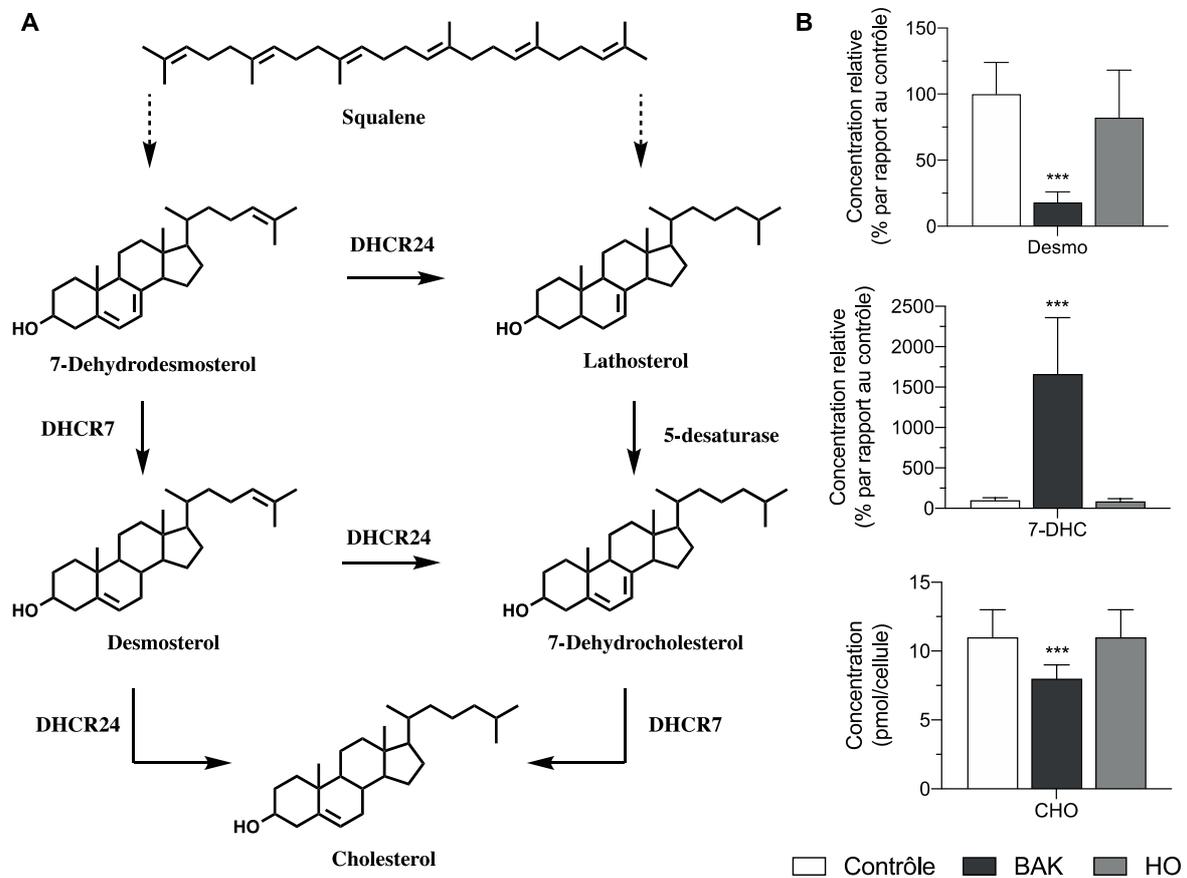


Figure 31 : Altération du métabolisme du cholestérol. (A) Voie de biosynthèse du cholestérol. (B) Changement du taux cellulaire du desmostérol, 7-déhydrocholestérol et cholestérol après exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm l'écart type ($n = 12$).

4.6.2. Analyse lipidomique ciblée après exposition à l'hyperosmolarité

Aucune modification du taux de cholestérol cellulaire n'est observée après exposition des cellules à l'hyperosmolarité (**Figure 30**). En revanche, les taux cellulaires de 7-KC et de 25-OH-Cho sont également augmentés après exposition des cellules à l'hyperosmolarité ($p < 0,05$). Enfin, le taux cellulaire de 24-OH-Cho n'est pas modulé après exposition à l'hyperosmolarité.

4.7. Expression d'enzymes impliquées dans la biosynthèse des lipides

Les résultats de l'analyse lipidomique globale ont révélé des changements de profils lipidiques après exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité et notamment une augmentation des Cer et des SM (**Figure 29**). L'expression d'enzymes-clefs de la biosynthèse des céramides a été explorée incluant une céramidase (ASAH2), une sphingomyélinase (SMPD2), et une céramide synthase (CerS2). Le métabolisme des phospholipides est également altéré après exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité (**Figure 29**). Les LPC sont respectivement augmentés et diminués après exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité (**Figure 29**). La phospholipase A1, une enzyme clivant les glycérophospholipides en leur forme lysophosphatidique, a également été évaluée au niveau de l'expression génique après exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité. Enfin, les TG sont également des espèces modulées au cours de l'exposition au BAK et à l'hyperosmolarité (**Figure 29**). L'enzyme responsable de la conversion des DG en TG est la DGAT1 [71] ; son expression génique a été évaluée.

4.7.1. Expression après exposition au BAK

L'analyse de l'expression génique d'enzymes impliquées dans la biosynthèse des lipides, et notamment, CerS2, SPMD2, ASAH2, DGAT1 et PLA1, ne montre pas de différence après exposition des cellules aux concentrations de BAK (**Figure 32**)

4.7.2. Expression après exposition à l'hyperosmolarité

L'analyse de l'expression génique d'enzymes impliquées dans la biosynthèse des lipides montre une augmentation significative de l'expression de CerS2, ASAH2, DGAT1 et PLA1 ($p < 0,01$) (**Figure 32**) pour une valeur osmolaire de 500 mOsm. De plus, une légère augmentation est observée pour l'expression de SMPD2 ($p < 0,05$).

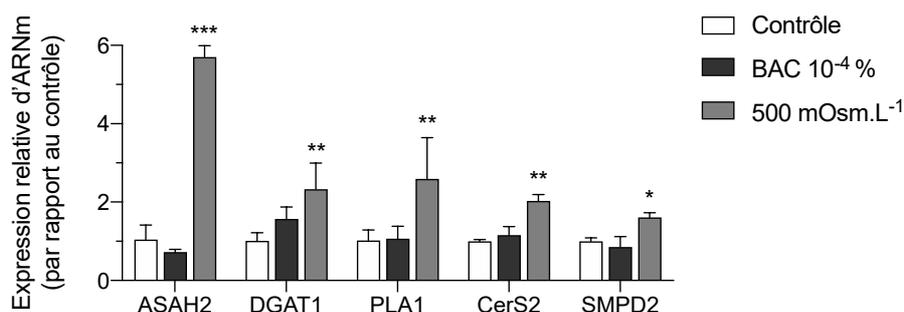


Figure 32 : Altération du métabolisme des sphingolipides, phospholipides et glycerophospholipides. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm l'écart type (n = 4).

4.8. Coloration des triglycérides

Les résultats de l'analyse lipidomique globale par UPLC-HRMS-ESI+/- ont montré une accumulation des TG lors de l'exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité (**Figure 33**). L'accumulation de TG peut conduire à la formation de gouttelettes lipidiques [113] visibles après coloration à l'huile rouge en microscopie à fluorescence. Les résultats montrent la présence de gouttelettes visibles après exposition des cellules à 500 mOsm (**Figure 33**). Aucune gouttelette n'est visible après exposition au BAK. La coloration au *Rouge Nile* permet également de visualiser les gouttelettes et a conduit aux mêmes observations qu'avec l'huile rouge.

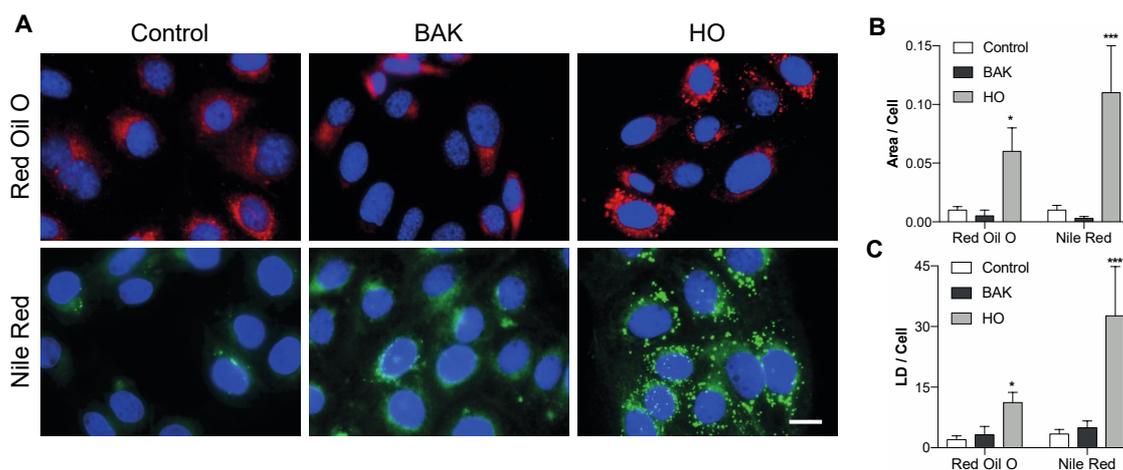


Figure 33 : Coloration des gouttelettes lipidiques. (A) Coloration à l'huile rouge et au rouge nile. (B) Aire et (C) quantité de gouttelettes lipidiques après exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm l'écart type (n = 4).

Discussion & Conclusion

5. Discussion

La sécheresse oculaire est une pathologie chronique qui s'accompagne d'une instabilité du film lacrymal, d'une hyperosmolarité et d'une inflammation de la surface oculaire, traits physiopathologiques majeurs qui concourent à l'entretien de la pathologie. Les étiologies sont variées, elles incluent des causes auto-immunes mais également extrinsèques telle que l'exposition à des xénobiotiques, notamment des toxiques environnementaux mais aussi certains excipients des médicaments appliqués sur l'œil. Ces excipients sont essentiellement des conservateurs, dont le BAK, utilisés dans la formulation des collyres, est le principal représentant. L'hyperosmolarité et le BAK utilisés *in vitro* et *in vivo* constituent par conséquent des modèles de la sécheresse oculaire, permettant l'étude de la pathologie. La compréhension des mécanismes physiopathologiques de la sécheresse oculaire reste une thématique importante dans le but *in fine* de déterminer des candidats biomarqueurs ou cibles thérapeutiques potentielles. Dans cette étude, nous nous sommes focalisées sur la caractérisation des modifications lipidiques affectant la lignée HCE-T, cellules cornéennes humaines, après exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité. Dans une première partie de cette discussion, la pertinence du modèle et sa validation sera présentée puis, dans une seconde partie, les résultats des analyses lipidomiques globales et ciblées.

5.1. Choix et validation du modèle

5.1.1. Etude de viabilité et choix des doses

Les concentrations en BAK et les valeurs hyperosmolaires utilisées lors de l'analyse lipidomique ont été choisies à l'aide d'une étude de viabilité. Ces concentrations ont été déterminées afin d'induire une réaction cellulaire. Sur la base des résultats obtenus (**Figure 22**) la concentration de BAK et la valeur osmolaire sont respectivement 10^{-4} % et 500 mOsM.

Dans les préparations ophtalmiques, la concentration en BAK varie entre 0,004% et 0,02% [49,52]. Peu de données concernant la pharmacocinétique du BAK au niveau oculaire sont disponibles, néanmoins, ce conservateur été retrouvé *in vivo* dans la cornée de lapin traité, jusqu'à 7 jours après instillation d'une seule goutte. Ce résultat montre la persistance au niveau oculaire de ce composé dont la demi-vie est d'une vingtaine d'heures [54]. Une

autre étude, également chez le lapin, réalisée en imagerie par spectrométrie de masse, a montré l'imprégnation des tissus oculaires par le BAK jusque dans les structures profondes du segment antérieur, du pôle postérieur et de la zone du nerf optique après application d'une solution de BAK (1 goutte/jour pendant 5 mois ou 2 gouttes/jour pendant 1 mois) [54]. Compte tenu de la dilution et de l'élimination du BAK dans le film lacrymal et les larmes, les concentrations retenues dans le cadre de notre étude semblent cohérentes avec une exposition *in vivo*. En outre, elles correspondent à une dilution au 1/100 des concentrations classiques des collyres qui a déjà été validée [114].

5.1.2. Modèles d'étude et surexpressions géniques de médiateurs inflammatoires

La sécheresse oculaire s'accompagne de la surexpression de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, retrouvées notamment dans les larmes des patients [3,34,35]. Des études *in vitro* sur une lignée cellulaire de la conjonctive ont montré une augmentation des cytokines pro-inflammatoires après exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité [11,115,116]. Afin de déterminer si notre modèle exprime ces médiateurs inflammatoires, nous avons réalisé une étude de l'expression génique de l'*IL1B*, de l'*IL6*, du *CCL2* et de la *NOX1*. Nos résultats montrent une surexpression génique de l'*IL1B* et de l'*IL6* après exposition au BAK (**Figure 24 A**) et de *CCL2*, de la *NOX1* et de l'*IL6* après exposition hyperosmolaire (**Figure 24 B**). Ces résultats sont en accord avec la littérature [10–12,116]. Ainsi, les cellules HCE-T exposées au BAK ou à l'hyperosmolarité expriment des marqueurs inflammatoires retrouvés dans des modèles *in vitro* et *in vivo* déjà décrits et chez le patient souffrant de sécheresse oculaire.

5.1.3. Modèles d'étude et surexpressions protéiques de médiateurs inflammatoires

Une activation des MAPK, protéines impliquées dans la signalisation cellulaire après exposition à certains xénobiotiques, est décrite dans des études mécanistiques visant à comprendre la physiopathologie de la sécheresse oculaire [117]. La phosphorylation des MAPK engendre une cascade d'activations aboutissant à l'augmentation de la transcription de gènes dont certains sont impliqués dans l'inflammation [118]. *In fine*, l'expression de ces formes actives de MAPK peut conduire à la production d'IL-8, cytokine pro inflammatoire [117]. Nous avons donc voulu vérifier si l'exposition des cellules HCE-T au BAK ou à l'hyperosmolarité conduit à la surexpression des formes phosphorylées de MAPK (**Figure 25**).

Nos résultats montrent que l'exposition au BAK engendre une augmentation de la forme phosphorylée de p42/44 tandis que l'exposition à l'hyperosmolarité induit une augmentation de la forme phosphorylée de p38, en accord avec les données disponibles dans la littérature [119].

5.1.4. Validation du modèle HCE-T/BAK-HO

Les résultats précédents montrent que l'exposition des cellules HCE aux concentrations choisies en BAK et en osmolarité conduit à l'expression des marqueurs inflammatoires et de souffrance cellulaire classiquement retrouvés dans des modèles de sécheresse oculaire, tant au niveau génique que protéique. Ces résultats valident notre modèle d'étude *in vitro*.

5.2. Modification du profil lipidique après exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité

Le profil lipidique des cellules HCE-T après exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité a été déterminé à l'aide d'une analyse lipidomique globale. Effectivement, cette approche permet de caractériser sans *a priori* qualitativement et quantitativement les changements de profil lipidique. Les résultats montrent une modification du taux cellulaire de certains glycérolipides, glycérophospholipides et sphingolipides (**Figure 29**). Nous présentons dans un premier temps par sous-classes, les espèces lipidiques dont le taux est modifié aussi bien après exposition au BAK qu'après exposition à l'hyperosmolarité. Dans un second temps, seront présentées, toujours par sous-classe, les espèces lipidiques dont la modulation est spécifique du BAK ou de l'hyperosmolarité.

5.2.1. Exposition au BAK et à l'hyperosmolarité et modulation de la sous-classe des céramides

Notre étude montre que l'exposition au BAK comme à l'hyperosmolarité induit une augmentation du taux cellulaire de certains céramides et sphingomyélines. Effectivement, de nombreuses espèces appartenant à ces deux sous-classes sont modulées (**Figure 29**). Citons en particulier le Cer (42:2) dont l'augmentation est de 88% et 92% après exposition au BAK 10^{-4} % et à 500 mOsM, respectivement. Un résultat similaire a été décrit après exposition au BAK d'un modèle 3D d'épithélium reconstruit de la cornée [120]. Une augmentation des Cer a

également été décrite chez la cellule HCE-T après exposition à l'hyperosmolarité [117]. Cependant, les études précédentes se sont intéressées à des expositions de courtes durées, de 1 à 4 heures pour l'exposition à l'hyperosmolarité et de 10 minutes pour l'exposition au BAK. De plus, les concentrations utilisées en BAK étaient plus importantes que celle utilisée dans notre étude. Nos résultats indiquent quant à eux une persistance des effets à 24 heures et à des doses plus proches de celles observées chez les patients.

Les Cer jouent un rôle dans l'inflammation [121–123], notamment au niveau du segment antérieur de l'œil [117,124]. Afin de comprendre l'origine de l'accumulation des Cer observés dans notre modèle, nous nous sommes intéressés à l'expression génique de certaines enzymes impliquées dans la biosynthèse de ces lipides. La biosynthèse des Cer est relativement complexe ; ils peuvent être produits *de novo* à partir du palmitoyl-CoA, provenir de la dégradation des SM par action de Sphingomyélinase (SMase) et être issus des sphingosines par action de la CerSynthase (CerS) [77,79,82]. Dans ce contexte, l'expression génique de la sphingomyélinase (SMPD2) et de la Céramide Synthase (CerS2) ont été évaluées. Une modulation du catabolisme des Cer a également été explorée par l'évaluation de l'expression génique d'une Céramidase (ASAH2).

Les résultats ne montrent pas de modification de l'expression génique des enzymes précédentes après exposition des cellules HCE-T au BAK ou à l'hyperosmolarité (**Figure 32**). Ces résultats sont en accord avec les données préalablement publiées pour l'expression de la CerS2 [120]. Cette absence de changement pourrait être expliquée par le fait que, parmi les 6 isoformes des CerS, chacun catalysant la formation de Cer en fonction de la longueur de chaîne [85] ; celle explorée ne présente pas d'expression modulée. L'exploration des autres isoformes de cette enzyme permettrait de conclure quant à leur implication dans l'accumulation de Cer lors de l'exposition au BAK.

Après exposition à l'hyperosmolarité, le gène codant pour CerS2 est surexprimé ; à notre connaissance, ce résultat n'a jamais été montré auparavant. Notre étude révèle également la surexpression génique d'ASAH2. Ce résultat a, quant à lui, déjà été rapporté après exposition des cellules HCE-T à l'hyperosmolarité pendant 4 heures [124]. La surexpression observée dans notre étude est en faveur d'une augmentation de la dégradation des céramides en sphingosines, composés ayant également des propriétés inflammatoires et

apoptotiques. La modulation des céramides et de leurs métabolites pourrait jouer un rôle dans le mécanisme de toxicité du BAK et dans les processus inflammatoires découlant de l'hyperosmolarité, facteur central de la sécheresse oculaire. Afin de conclure sur l'implication des enzymes de la biosynthèse des lipides dans l'accumulation des Cer, des études d'expression génique sur les autres isoformes et des études enzymatiques fonctionnelles seront nécessaires.

5.2.2. Exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité et modulation de la sous-classe des Triglycérides

L'exposition des cellules HCE-T au BAK conduit à l'augmentation d'un seul triglycéride, TG (42:5). En revanche, l'exposition à l'hyperosmolarité engendre l'augmentation du taux cellulaire de 15 TG (**Figure 29**). Afin de confirmer cette modulation, une coloration à l'huile rouge a été réalisée. Effectivement, cette coloration permet, au niveau cellulaire, de visualiser et localiser les TG sous forme de gouttelettes lipidiques [113]. Aucune gouttelette n'est observée après exposition au BAK (**Figure 33**). En revanche, confirmant les résultats obtenus lors de l'analyse lipidomique, l'exposition à l'hyperosmolarité conduit à l'apparition de gouttelettes dans les cellules HCE-T. Ce résultat a déjà été rapporté avec cette lignée cellulaire 2 heures après exposition à l'hyperosmolarité [117].

L'augmentation des TG pourrait avoir pour origine une modulation de l'expression de la diacylgycéroltransférase (DGAT), enzyme responsable de la biosynthèse des TG à partir des DG [71]. De fait, dans notre étude, nous avons constaté une augmentation très modérée de la DGAT 1 lors de l'exposition au BAK. Après exposition à l'hyperosmolarité, l'augmentation des transcrits codant pour la DGAT1 est en revanche très marquée, 3 fois supérieure à celle du contrôle. Cette différence de résultats est en accord avec le nombre de TG modulés en fonction de l'exposition. D'un point de vue physiologique, les gouttelettes lipidiques ont un rôle dans l'inflammation et sont le siège de la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires tels que les prostaglandines [125]. Ces différents résultats suggèrent que le dosage de TG, l'expression de la DGAT1 ou encore la coloration des GL, reflet de la modulation du métabolisme des TG, pourraient être utilisés comme marqueurs de l'exposition hyperosmolaire et pourraient avoir un intérêt dans la prise en charge de la sécheresse

oculaire. Des expériences de réversions pharmacologiques utilisant des systèmes de siRNA ou d'antagonistes permettraient de confirmer nos résultats.

5.2.3. Marqueurs d'intérêt potentiel d'exposition au BAK

Bien que l'exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité conduisent pour l'essentiel à des changements du lipidome similaires, il est important de souligner que certaines modifications du lipidome sont spécifiques de l'exposition au BAK et d'autres à une hyperosmolarité (**Figure 29**). Effectivement, alors que l'exposition au BAK conduit à une augmentation de certains lipides appartenant aux sous-classes LPC, LPE et PI-P, l'exposition à l'hyperosmolarité engendre dans ces mêmes sous-classes une diminution de plusieurs espèces lipidiques. L'exposition au BAK conduit aussi à une diminution de certains lipides appartenant aux sous-classes PC, PE et PS, alors que l'exposition à l'hyperosmolarité engendre une augmentation de ces mêmes sous-classes. Parmi les lipides spécifiquement modulés après exposition des cellules HCE-T au BAK, l'effet sur le LPE (18:0) est le plus important puisqu'il est augmenté de 160%. Dans le contexte d'une sécheresse oculaire dont l'étiologie est associée au BAK, des études complémentaires pourraient permettre d'évaluer l'intérêt du dosage de ce lipide comme biomarqueur dans les larmes ou les empreintes conjonctivales des patients. Il en est de même pour le LPC (18:1), augmenté de 100%, et le PS (36:0), diminué de 86%.

5.3. Modulation des stérols après exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité

5.3.1. Effets du BAK sur le cholestérol cellulaire

Notre étude indique que l'exposition des cellules HCE-T au BAK engendre une diminution du taux cellulaire de cholestérol (**Figure 31**). L'étude de la voie de biosynthèse du cholestérol fait apparaître une diminution du desmostérol et une augmentation du 7-DHC, précurseurs du cholestérol. Le 7-DHC est converti en cholestérol et le 7-déhydrodesmostérol est transformé en desmostérol lui-même transformé en cholestérol sous l'effet de la DHCR24 (**Figure 30**). La baisse du desmostérol concomitante à celle du cholestérol souligne l'implication de la déhydrocholestérol réductase (DHCR7). Pour les deux réactions dépendantes de la DHCR7, il serait important de vérifier si dans notre modèle, l'expression génique ou protéique de ces deux enzymes est modifiée. En ce sens, une étude a montré que la diminution du cholestérol lors de l'exposition au BAK de cellules de neuroblastome était

liée à une diminution de l'expression génique de la DHCR7 [126]. Une diminution de la concentration cellulaire du cholestérol et du desmosterol pourrait expliquer en partie la toxicité du BAK dans l'altération cornéenne. La DHCR7 pourrait représenter une cible d'intérêt de la toxicité du BAK d'autant plus que ces résultats ne sont pas observés dans le modèle de l'hyperosmolarité.

5.3.2. Modulations des oxystérols après exposition au BAK ou à l'hyperosmolarité

Le métabolisme du cholestérol conduit principalement à la formation d'oxystérols : 24-, 25-, et 27-hydroxycholestérol. L'exposition des cellules HCE-T au BAK ou à l'hyperosmolarité conduit à l'augmentation du 25-OH dont les effets pro-inflammatoires et apoptotiques sont connus [84]. Alors qu'une étude sur les kératinocytes, autre type cellulaire épithéliale, a montré que le 25-OH était responsable d'une cytotoxicité et agissait sur la différenciation aucune étude n'a confirmé ces résultats sur des cellules cornéennes [127]. De plus, notre étude montre que le BAK est à l'origine d'une légère diminution du 24-OH et du 27-OH qui pourrait être reliée à la diminution du cholestérol. D'autres métabolites d'oxydation existent [84], notamment le 7-Kétocholestérol qui est impliqué dans de nombreuses pathologies en raison de ses propriétés pro-apoptiques et pro-inflammatoires [128].

L'étude de ces métabolites après exposition des cellules HCE-T au BAK ou à l'hyperosmolarité fait également apparaître une augmentation du 7-KC dépendant de la concentration. Alors qu'aucune étude n'a concerné la toxicité du 7-KC sur la cornée, une action pro-inflammatoire marquée au niveau rétinien a été rapportée [129,130]. Cette action conduit à l'activation de NFκB et ATF4 majoritairement médiée par le récepteur TLR-4 [131]. Des études mécanistiques seront nécessaires afin d'évaluer l'effet du 7-KC sur la toxicité cornéenne et dans la physiopathologie de la sécheresse oculaire.

L'ensemble de ces résultats montre néanmoins que les oxystérols et les précurseurs du cholestérol pourraient jouer un rôle dans le mécanisme de toxicité du BAK et dans la physiopathologie de la sécheresse oculaire.

6. Conclusion

La sécheresse oculaire est actuellement une problématique de santé publique croissante. La compréhension des mécanismes sous-tendant l'apparition et l'entretien de la pathologie est essentielle pour définir des cibles diagnostiques et thérapeutiques. Cette étude réalisée sur deux modèles *in vitro* de sécheresse oculaire, les cellules cornéennes humaines HCE-T exposées au chlorure de benzalkonium ou à l'hyperosmolarité, confirme une modification du profil lipidique de ces cellules.

L'analyse lipidomique réalisée par UPLC-HRMS-ESI+/- indique que certains de ces changements, portant sur les sphingolipides, glycérolipides, glycérophospholipides et stérols, apparaissent propres à chacune des expositions. Des analyses d'expression génique ont permis d'expliquer l'origine de certaines des modifications du lipidome, notamment l'implication de certaines enzymes du métabolisme des lipides comme la CerS2 et la DGAT1. En outre, l'utilisation de techniques d'imagerie en fluorescence nous a également permis de confirmer l'accumulation des TG par l'apparition de gouttelettes lipidiques lors de l'exposition à l'hyperosmolarité. La présence de ces gouttelettes pourrait constituer un marqueur cytologique de l'hyperosmolarité dans le diagnostic des sécheresses oculaires.

Cette étude donne des informations sur des modifications du taux cellulaire de certains lipides en lien avec des processus inflammatoires ou de mort cellulaire. Ces résultats pourraient servir pour des études mécanistiques ultérieures ciblant une voie altérée spécifiquement. En outre, la compréhension des modifications lipidiques nécessite des études en cinétiques afin de mieux comprendre quand et comment sont régulés les lipides.

Les différentes modulations lipidiques observés dans nos modèles nécessitent d'être confirmées, *in vivo* dans des modèles murins de sécheresse oculaire puis, chez l'homme, à partir d'empreintes conjonctivales. D'un point de vue clinique, certains des lipides modulés lors de l'exposition au BAK pourraient être utilisés comme marqueurs d'effets délétères de ce conservateur et pourraient être utilisés dans l'exploration d'autres toxiques pouvant affecter la surface oculaire. Les lipides modulés au cours de l'exposition hyperosmolaire pourraient quant à eux être utilisés pour le diagnostic de la sécheresse oculaire et dans l'identification de cibles thérapeutiques plus spécifiques de l'étiologie.

Références bibliographiques

7. Bibliographie

- [1] C. Baudouin, P. Aragona, E.M. Messmer, A. Tomlinson, M. Calonge, K.G. Boboridis, Y.A. Akova, G. Geerling, M. Labetoulle, M. Rolando, Role of hyperosmolarity in the pathogenesis and management of dry eye disease: Proceedings of the ocean group meeting, *Ocul. Surf.* 11 (2013) 246–258. doi:10.1016/j.jtos.2013.07.003.
- [2] A.J. Bron, C.S. de Paiva, S.K. Chauhan, S. Bonini, E.E. Gabison, S. Jain, E. Knop, M. Markoulli, Y. Ogawa, V. Perez, Y. Uchino, N. Yokoi, D. Zoukhri, D.A. Sullivan, TFOS DEWS II pathophysiology report, *Ocul. Surf.* 15 (2017) 438–510. doi:10.1016/j.jtos.2017.05.011.
- [3] S.C. Pflugfelder, C.S. de Paiva, The Pathophysiology of Dry Eye Disease: What We Know and Future Directions for Research, *Ophthalmology.* 124 (2017) S4–S13. doi:10.1016/j.ophtha.2017.07.010.
- [4] W. Stevenson, S.K. Chauhan, R. Dana, Dry Eye Disease, *Arch. Ophthalmol.* 130 (2012) 90. doi:10.1001/archophthalmol.2011.364.
- [5] C. Baudouin, E.M. Messmer, P. Aragona, G. Geerling, Y.A. Akova, J. Benítez-Del-Castillo, K.G. Boboridis, J. Merayo-Llives, M. Rolando, M. Labetoulle, Revisiting the vicious circle of dry eye disease: A focus on the pathophysiology of meibomian gland dysfunction, *Br. J. Ophthalmol.* 100 (2016) 300–306. doi:10.1136/bjophthalmol-2015-307415.
- [6] J.P. Craig, K.K. Nichols, E.K. Akpek, B. Caffery, H.S. Dua, C. Joo, Z. Liu, J.D. Nelson, J.J. Nichols, K. Tsubota, F. Stapleton, The Ocular Surface TFOS DEWS II Definition and Classification Report, 15 (2017) 276–283. doi:10.1016/j.jtos.2017.05.008.
- [7] J.A.P. Gomes, D.T. Azar, C. Baudouin, N. Efron, M. Hirayama, J. Horwath-Winter, T. Kim, J.S. Mehta, E.M. Messmer, J.S. Pepose, V.S. Sangwan, A.L. Weiner, S.E. Wilson, J.S. Wolffsohn, TFOS DEWS II iatrogenic report, *Ocul. Surf.* 15 (2017) 511–538. doi:10.1016/j.jtos.2017.05.004.
- [8] M. De Saint Jean, C. Debbasch, F. Brignole, P. Rat, J.M. Warnet, C. Baudouin, Toxicity of preserved and unpreserved antiglaucoma topical drugs in an in vitro model of conjunctival cells., *Curr. Eye Res.* 20 (2000) 85–94. doi:10.176/0271-3683(200002)20:2;1-d;ft085.
- [9] C. Clouzeau, D. Godefroy, L. Riancho, W. Rostène, C. Baudouin, F. Brignole-Baudouin, Hyperosmolarity potentiates toxic effects of benzalkonium chloride on conjunctival epithelial cells in vitro., *Mol. Vis.* 18 (2012) 851–63.
- [10] X. Hua, R. Deng, J. Li, W. Chi, Z. Su, J. Lin, S. Pflugfelder, D. Li, Protective Effects of L-Carnitine Against Oxidative Injury by Hyperosmolarity in Human Corneal Epithelial Cells, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56 (2015) 5503–11.
- [11] E. Warcoin, C. Clouzeau, C. Roubexis, A.L. Raveu, D. Godefroy, L. Riancho, C. Baudouin, F. Brignole-Baudouin, Hyperosmolarity and Benzalkonium Chloride Differently Stimulate Inflammatory Markers in Conjunctiva-Derived Epithelial Cells in vitro, *Ophthalmic Res.* 58 (2017) 40–48. doi:10.1159/000448117.
- [12] M.E. Cavet, K.L. Harrington, T.R. Vollmer, K.W. Ward, J.-Z. Zhang, Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of the green tea polyphenol epigallocatechin gallate in human

- corneal epithelial cells., *Mol. Vis.* 17 (2011) 533–42. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3044696&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [13] E. Agmon, B.R. Stockwell, Lipid homeostasis and regulated cell death, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 39 (2017) 83–89. doi:10.1016/j.cbpa.2017.06.002.
- [14] L. Magtanong, P.J. Ko, S.J. Dixon, Emerging roles for lipids in non-apoptotic cell death, *Cell Death Differ.* 23 (2016) 1099–1109. doi:10.1038/cdd.2016.25.
- [15] M. Maceyka, S. Spiegel, Sphingolipid metabolites in inflammatory disease, *Nature.* 510 (2014) 58–67. doi:10.1038/nature13475.
- [16] P.J. Meikle, S.A. Summers, Sphingolipids and phospholipids in insulin resistance and related metabolic disorders, *Nat. Rev. Endocrinol.* 13 (2017) 79–91. doi:10.1038/nrendo.2016.169.
- [17] M. Régnier, A. Polizzi, H. Guillou, N. Loiseau, Sphingolipid metabolism in non-alcoholic fatty liver diseases, *Biochimie.* 159 (2019) 9–22. doi:10.1016/j.biochi.2018.07.021.
- [18] S. Priyadarsini, A. Sarker-Nag, J. Allegood, C. Chalfant, D. Karamichos, Description of the sphingolipid content and subspecies in the diabetic cornea., *Curr. Eye Res.* 40 (2015) 1204–10. doi:10.3109/02713683.2014.990984.
- [19] B.M. Ham, J.T. Jacob, M.M. Keese, R.B. Cole, Identification, quantification and comparison of major non-polar lipids in normal and dry eye tear lipidomes by electrospray tandem mass spectrometry., *J. Mass Spectrom.* 39 (2004) 1321–36. doi:10.1002/jms.725.
- [20] S.M. Lam, L. Tong, B. Reux, X. Duan, A. Petznick, S.S. Yong, C.B.S. Khee, M.J. Lear, M.R. Wenk, G. Shui, Lipidomic analysis of human tear fluid reveals structure-specific lipid alterations in dry eye syndrome, *J. Lipid Res.* 55 (2014) 299–306. doi:10.1194/jlr.P041780.
- [21] Y.A. Ambaw, C. Chao, S. Ji, M. Raida, F. Torta, M.R. Wenk, L. Tong, Tear eicosanoids in healthy people and ocular surface disease., *Sci. Rep.* 8 (2018) 11296. doi:10.1038/s41598-018-29568-3.
- [22] J. Chen, K.K. Nichols, L. Wilson, S. Barnes, J.J. Nichols, Untargeted lipidomic analysis of human tears: A new approach for quantification of O-acyl-omega hydroxy fatty acids., *Ocul. Surf.* 17 (2019) 347–355. doi:10.1016/j.jtos.2019.02.004.
- [23] A. Robciuc, T. Hyo, Ceramides in the Pathophysiology of the Anterior Segment of the Eye *, (2013) 1–11. doi:10.3109/02713683.2013.810273.
- [24] D.A. Dartt, Regulation of mucin and fluid secretion by conjunctival epithelial cells., *Prog. Retin. Eye Res.* 21 (2002) 555–76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12433377> (accessed August 23, 2019).
- [25] T.G. Rowsey, D. Karamichos, The role of lipids in corneal diseases and dystrophies: a systematic review, *Clin. Transl. Med.* 6 (2017) 30. doi:10.1186/s40169-017-0158-1.
- [26] K.M. Meek, Corneal collagen-its role in maintaining corneal shape and transparency, *Biophys. Rev.* 1 (2009) 83–93. doi:10.1007/s12551-009-0011-x.
- [27] M. Yazdani, K.B.P. Elgstøen, H. Rootwelt, A. Shahdadfar, Ø.A. Utheim, T.P. Utheim, Tear metabolomics in dry eye disease: A review, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 1–18.

doi:10.3390/ijms20153755.

- [28] S.M. Lam, L. Tong, B. Reux, X. Duan, A. Petznick, S.S. Yong, C.B.S. Khee, M.J. Lear, M.R. Wenk, G. Shui, Lipidomic analysis of human tear fluid reveals structure-specific lipid alterations in dry eye syndrome., *J. Lipid Res.* 55 (2014) 299–306. doi:10.1194/jlr.P041780.
- [29] I.A. Butovich, Tear film lipids, *Exp. Eye Res.* 117 (2013) 4–27. doi:10.1016/j.exer.2013.05.010.
- [30] L. Cwiklik, Tear film lipid layer: A molecular level view, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858 (2016) 2421–2430. doi:10.1016/j.bbamem.2016.02.020.
- [31] S.M. Lam, L. Tong, S.S. Yong, B. Li, S.S. Chaurasia, G. Shui, M.R. Wenk, Meibum lipid composition in Asians with dry eye disease, *PLoS One.* 6 (2011). doi:10.1371/journal.pone.0024339.
- [32] J.D. Nelson, J.P. Craig, E.K. Akpek, D.T. Azar, C. Belmonte, A.J. Bron, J.A. Clayton, M. Dogru, H.S. Dua, G.N. Foulks, J.A.P. Gomes, K.M. Hammit, J. Holopainen, L. Jones, C.-K. Joo, Z. Liu, J.J. Nichols, K.K. Nichols, G.D. Novack, V. Sangwan, F. Stapleton, A. Tomlinson, K. Tsubota, M.D.P. Willcox, J.S. Wolffsohn, D.A. Sullivan, TFOS DEWS II Introduction, *Ocul. Surf.* 15 (2017) 269–275. doi:10.1016/j.jtos.2017.05.005.
- [33] J. Benítez-del-Castillo, M. Labetoulle, C. Baudouin, M. Rolando, Y.A. Akova, P. Aragona, G. Geerling, J. Merayo-Llodes, E.M. Messmer, K. Boboridis, Visual acuity and quality of life in dry eye disease: Proceedings of the OCEAN group meeting, in: *Ocul. Surf.*, Elsevier Inc., 2017: pp. 169–178. doi:10.1016/j.jtos.2016.11.003.
- [34] M.L. Massingale, X. Li, M. Vallabhajosyula, D. Chen, Y. Wei, P.A. Asbell, Analysis of inflammatory cytokines in the tears of dry eye patients, *Cornea.* 28 (2009) 1023–1027. doi:10.1097/ICO.0b013e3181a16578.
- [35] K.S. Na, J.W. Mok, J.Y. Kim, C.R. Rho, C.K. Joo, Correlations between tear cytokines, chemokines, and soluble receptors and clinical severity of dry eye disease, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53 (2012) 5443–5450. doi:10.1167/iovs.11-9417.
- [36] M.K. Rhee, F.S. Mah, Inflammation in Dry Eye Disease: How Do We Break the Cycle?, *Ophthalmology.* 124 (2017) S14–S19. doi:10.1016/j.ophtha.2017.08.029.
- [37] F. Stapleton, M. Alves, V.Y. Bunya, I. Jalbert, K. Lekhanont, F. Malet, K.-S. Na, D. Schaumberg, M. Uchino, J. Vehof, E. Viso, S. Vitale, L. Jones, TFOS DEWS II Epidemiology Report, *Ocul. Surf.* 15 (2017) 334–365. doi:10.1016/j.jtos.2017.05.003.
- [38] D.A. Schaumberg, D.A. Sullivan, M.R. Dana, *Epidemiology of Dry Eye Syndrome*, in: Springer, Boston, MA, 2002: pp. 989–998. doi:10.1007/978-1-4615-0717-8_140.
- [39] S.E. Moss, R. Klein, B.E. Klein, Prevalence of and Risk Factors for Dry Eye Syndrome, *Arch. Ophthalmol.* 118 (2000) 1264. doi:10.1001/archophth.118.9.1264.
- [40] S.W. van Lindingham, S.K. West, E.K. Akpek, B. Muñoz, P.Y. Ramulu, Impact of dry eye on reading in a population-based sample of the elderly: the Salisbury Eye Evaluation, *Br. J. Ophthalmol.* 98 (2014) 639–644. doi:10.1136/bjophthalmol-2013-303518.
- [41] A.J. Paulsen, K.J. Cruickshanks, M.E. Fischer, G.-H. Huang, B.E.K. Klein, R. Klein, D.S. Dalton, Dry eye in the beaver dam offspring study: prevalence, risk factors, and health-related quality of life., *Am. J. Ophthalmol.* 157 (2014) 799–806. doi:10.1016/j.ajo.2013.12.023.

- [42] M. Uchino, Y. Nishiwaki, T. Michikawa, K. Shirakawa, E. Kuwahara, M. Yamada, M. Dogru, D.A. Schaumberg, T. Kawakita, T. Takebayashi, K. Tsubota, Prevalence and Risk Factors of Dry Eye Disease in Japan: Koumi Study, *Ophthalmology*. 118 (2011) 2361–2367. doi:10.1016/j.opthta.2011.05.029.
- [43] E.M. Chia, P. Mitchell, E. Rochtchina, A.J. Lee, R. Maroun, J.J. Wang, Prevalence and associations of dry eye syndrome in an older population: The Blue Mountains Eye Study, *Clin Exp. Ophthalmol*. 31 (2003) 229–232. doi:10.1046/j.1442-9071.2003.00634.x.
- [44] E. Viso, M.T. Rodriguez-Ares, F. Gude, Prevalence of and Associated Factors for Dry Eye in a Spanish Adult Population (The Salnes Eye Study), *Ophthalmic Epidemiol*. 16 (2009) 15–21. doi:10.1080/09286580802228509.
- [45] F. Malet, M. Le Goff, J. Colin, C. Schweitzer, M.-N. Delyfer, J.-F. Korobelnik, M.-B. Rougier, T. Radeau, J.-F. Dartigues, C. Delcourt, Dry eye disease in French elderly subjects: the Alienor Study, *Acta Ophthalmol*. 92 (2014) e429–e436. doi:10.1111/aos.12174.
- [46] M.A. Lemp, Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes., *CLAO J*. 21 (1995) 221–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8565190>.
- [47] Société française d’ophtalmologie., P.-J. Pisella, C. Baudouin, T. Hoang-Xuan, G. Renard, *Surface oculaire : rapport 2015*, Elsevier Masson, 2015.
- [48] C. Creuzot-Garcher, La sécheresse oculaire liée aux médicaments systémiques, *J. Fr. Ophtalmol*. 32 (2009) 64–70. doi:10.1016/j.jfo.2008.11.001.
- [49] D. Vaede, C. Baudouin, J.M. Warnet, F. Brignole-Baudouin, Les conservateurs des collyres: Vers une prise de conscience de leur toxicité, *J. Fr. Ophtalmol*. 33 (2010) 505–524. doi:10.1016/j.jfo.2010.06.018.
- [50] C. Baudouin, A. Labbé, H. Liang, A. Pauly, F. Brignole-Baudouin, Preservatives in eyedrops: The good, the bad and the ugly, *Prog. Retin. Eye Res*. 29 (2010) 312–334. doi:10.1016/j.preteyeres.2010.03.001.
- [51] F. Aptel, A. Labbé, C. Baudouin, A. Bron, Y. Lachkar, E. Sellem, J.-P. Renard, J.-P. Nordmann, J.-F. Rouland, P. Denis, Traitement du glaucome, conservateurs et surface oculaire, *J. Fr. Ophtalmol*. 37 (2014) 728–736. doi:10.1016/j.jfo.2014.06.005.
- [52] C. Baudouin, A. Labbé, H. Liang, A. Pauly, F. Brignole-Baudouin, Preservatives in eyedrops: The good, the bad and the ugly, *Prog. Retin. Eye Res*. 29 (2010) 312–334. doi:10.1016/j.preteyeres.2010.03.001.
- [53] C.A. Rasmussen, P.L. Kaufman, J.A. Kiland, Benzalkonium Chloride and Glaucoma, *J. Ocul. Pharmacol. Ther*. 30 (2014) 163–169. doi:10.1089/jop.2013.0174.
- [54] F. Brignole-Baudouin, N. Desbenoit, G. Hamm, H. Liang, J.P. Both, A. Brunelle, I. Fournier, V. Guerineau, R. Legouffe, J. Stauber, D. Touboul, M. Wisztorski, M. Salzet, O. Laprevote, C. Baudouin, A New Safety Concern for Glaucoma Treatment Demonstrated by Mass Spectrometry Imaging of Benzalkonium Chloride Distribution in the Eye, an Experimental Study in Rabbits, *PLoS One*. 7 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0050180.
- [55] A.M. Stevens, P.A. Kestelyn, D. De Bacquer, P.G. Kestelyn, Benzalkonium chloride induces anterior chamber inflammation in previously untreated patients with ocular hypertension as measured by flare meter: A randomized clinical trial, *Acta Ophthalmol*. 90 (2012) 221–224. doi:10.1111/j.1755-3768.2011.02338.x.

- [56] C. Baudouin, Detrimental effect of preservatives in eyedrops: implications for the treatment of glaucoma, *Acta Ophthalmol.* 86 (2008) 716–726. doi:10.1111/j.1755-3768.2008.01250.x.
- [57] A.A. Bonniard, J.Y. Yeung, C.C. Chan, C.M. Birt, A. Aguayo, J.Y. Yeung, C.C. Chan, C.M. Birt, Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology Ocular surface toxicity from glaucoma topical medications and associated preservatives such as benzalkonium chloride (BAK), 5255 (2016). doi:10.1080/17425255.2016.1209481.
- [58] T. Matsuo, Y. Tsuchida, N. Morimoto, Trehalose eye drops in the treatment of dry eye syndrome, *Ophthalmology.* 109 (2002) 2024–2029. doi:10.1016/S0161-6420(02)01219-8.
- [59] J.F. Borel, History of the discovery of cyclosporin and of its early pharmacological development., *Wien. Klin. Wochenschr.* 114 (2002) 433–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12422576> (accessed August 22, 2019).
- [60] P. Ames, A. Galor, Cyclosporine ophthalmic emulsions for the treatment of dry eye: a review of the clinical evidence, *Clin. Investig. (Lond).* 5 (2015) 267–285. doi:10.4155/cli.14.135.
- [61] C. Schultz, Safety and Efficacy of Cyclosporine in the Treatment of Chronic Dry Eye, *Ophthalmol. Eye Dis.* 6 (2014) OED.S16067. doi:10.4137/oed.s16067.
- [62] T. Rhen, J.A. Cidlowski, Antiinflammatory action of glucocorticoids - New mechanisms for old drugs, *N. Engl. J. Med.* 353 (2005) 1711–1723. doi:10.1056/NEJMra050541.
- [63] S. Ramamoorthy, J.A. Cidlowski, Corticosteroids, *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 42 (2016) 15–31. doi:10.1016/j.rdc.2015.08.002.
- [64] C. Creuzot-Garcher, P.-O. Lafontaine, F. Brignole, P.-J. Pisella, P. d’Athis, A. Bron, V. Lapierre, C. Baudouin, Traitement des syndromes secs graves par sérum autologue, (2008). <https://www.em-consulte.com/en/article/112795> (accessed August 22, 2019).
- [65] C. Zhang, K. Wang, L. Yang, R. Liu, Y. Chu, X. Qin, P. Yang, H. Yu, Lipid metabolism in inflammation-related diseases, *Analyst.* 143 (2018) 4526–4536. doi:10.1039/C8AN01046C.
- [66] E. Fahy, S. Subramaniam, H.A. Brown, C.K. Glass, A.H. Merrill, R.C. Murphy, C.R.H. Raetz, D.W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M.S. VanNieuwenhze, S.H. White, J.L. Witztum, E.A. Dennis, A comprehensive classification system for lipids, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 839–862. doi:10.1194/jlr.E400004-JLR200.
- [67] E. Fahy, S. Subramaniam, R.C. Murphy, M. Nishijima, C.R.H. Raetz, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M.J.O. Wakelam, E.A. Dennis, Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids, *J. Lipid Res.* 50 (2009) S9–S14. doi:10.1194/jlr.R800095-JLR200.
- [68] S.M. Lam, G. Shui, Lipidomics as a Principal Tool for Advancing Biomedical Research, *J. Genet. Genomics.* 40 (2013) 375–390. doi:10.1016/j.jgg.2013.06.007.
- [69] U.N. Das, Essential Fatty acids - a review., *Curr. Pharm. Biotechnol.* 7 (2006) 467–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17168664> (accessed August 23, 2019).
- [70] M. Gabbs, S. Leng, J.G. Devassy, M. Monirujjaman, H.M. Aukema, Advances in Our Understanding of Oxylipins Derived from Dietary PUFAs, *Adv. Nutr.* 6 (2015) 513–540. doi:10.3945/an.114.007732.

- [71] C.-L.E. Yen, S.J. Stone, S. Koliwad, C. Harris, R. V. Farese, *Thematic Review Series: Glycerolipids*. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis, *J. Lipid Res.* 49 (2008) 2283–2301. doi:10.1194/jlr.R800018-JLR200.
- [72] T.J. Tracey, F.J. Steyn, E.J. Wolvetang, S.T. Ngo, Neuronal lipid metabolism: Multiple pathways driving functional outcomes in health and disease, *Front. Mol. Neurosci.* 11 (2018) 1–25. doi:10.3389/fnmol.2018.00010.
- [73] B. Wang, P. Tontonoz, Phospholipid Remodeling in Physiology and Disease, *Annu. Rev. Physiol.* 81 (2019) 165–188. doi:10.1146/annurev-physiol-020518-114444.
- [74] S. Wallner, G. Schmitz, Plasmalogens the neglected regulatory and scavenging lipid species, *Chem. Phys. Lipids.* 164 (2011) 573–589. doi:10.1016/j.chemphyslip.2011.06.008.
- [75] N.E. Braverman, A.B. Moser, Functions of plasmalogen lipids in health and disease, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1822 (2012) 1442–1452. doi:10.1016/J.BBADIS.2012.05.008.
- [76] S. Paul, G.I. Lancaster, P.J. Meikle, Plasmalogens: A potential therapeutic target for neurodegenerative and cardiometabolic disease, *Prog. Lipid Res.* 74 (2019) 186–195. doi:10.1016/j.plipres.2019.04.003.
- [77] B. Chaurasia, S.A. Summers, Ceramides – Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders, *Trends Endocrinol. Metab.* 26 (2015) 538–550. doi:10.1016/j.tem.2015.07.006.
- [78] P. Fagone, S. Jackowski, Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function, *J. Lipid Res.* 50 (2009) S311. doi:10.1194/jlr.R800049-JLR200.
- [79] Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 139–150. doi:10.1038/nrm2329.
- [80] S. Rodriguez-Cuenca, N. Barbarroja, A. Vidal-Puig, Dihydroceramide desaturase 1, the gatekeeper of ceramide induced lipotoxicity, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1851 (2015) 40–50. doi:10.1016/j.bbalip.2014.09.021.
- [81] C. Li, S. Guo, W. Pang, Z. Zhao, Crosstalk Between Acid Sphingomyelinase and Inflammasome Signaling and Their Emerging Roles in Tissue Injury and Fibrosis, *Front. Cell Dev. Biol.* 7 (2020) 1–10. doi:10.3389/fcell.2019.00378.
- [82] Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19 (2018) 175–191. doi:10.1038/nrm.2017.107.
- [83] N.M.F.S.A. Cerqueira, E.F. Oliveira, D.S. Gesto, D. Santos-Martins, C. Moreira, H.N. Moorthy, M.J. Ramos, P.A. Fernandes, Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview, *Biochemistry.* 55 (2016) 5483–5506. doi:10.1021/acs.biochem.6b00342.
- [84] M. Souidi, S. Dubrac, M. Parquet, D.H. Volle, J.-M.A. Lobaccaro, D. Mathé, O. Combes, P. Scanff, C. Lutton, J. Aigueperse, Les oxystérols : métabolisme, rôles biologiques et pathologies associées, *Gastroentérologie Clin. Biol.* 28 (2004) 279–293. doi:10.1016/S0399-8320(04)94919-6.
- [85] S. Grösch, S. Schiffmann, G. Geisslinger, Progress in Lipid Research Chain length-specific properties of ceramides, 51 (2012) 50–62. doi:10.1016/j.plipres.2011.11.001.
- [86] W.C. Gordon, N.G. Bazan, Mediator lipidomics in ophthalmology: Targets for modulation in inflammation, neuroprotection and nerve regeneration, *Curr. Eye Res.*

- 38 (2013) 995–1005. doi:10.3109/02713683.2013.827211.
- [87] J.L. Stith, F.N. Velazquez, L.M. Obeid, Advances in determining signaling mechanisms of ceramide and role in disease, *J. Lipid Res.* 60 (2019) 913–918. doi:10.1194/jlr.s092874.
- [88] V. Dormoy, T. Massfelder, La métabolomique au service de la médecine - L'exemple du carcinome rénal, *Médecine/Sciences.* 29 (2013) 463–468. doi:10.1051/medsci/2013295007.
- [89] J. Wang, C. Wang, X. Han, Tutorial on lipidomics, *Anal. Chim. Acta.* 1061 (2019) 28–41. doi:10.1016/j.aca.2019.01.043.
- [90] B. Fuchs, R. Süß, K. Teuber, M. Eibisch, J. Schiller, Lipid analysis by thin-layer chromatography-A review of the current state, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 2754–2774. doi:10.1016/j.chroma.2010.11.066.
- [91] M. Pinault, C. Guimaraes, J. Dumas, S. Servais, S. Chevalier, P. Besson, C. Goupille, A 1D High Performance Thin Layer Chromatography Method Validated to Quantify Phospholipids Including Cardiolipin and Monolysocardiolipin from Biological Samples, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 122 (2020) 1900240. doi:10.1002/ejlt.201900240.
- [92] A. Amiel, M. Tremblay-Franco, R. Gautier, S. Ducheix, A. Montagner, A. Polizzi, L. Debrauwer, H. Guillou, J. Bertrand-Michel, C. Canlet, Proton NMR Enables the Absolute Quantification of Aqueous Metabolites and Lipid Classes in Unique Mouse Liver Samples, *Metabolites.* 10 (2019) 9. doi:10.3390/metabo10010009.
- [93] T. Züllig, M. Trötzmüller, H.C. Köfeler, Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer, *Anal. Bioanal. Chem.* (2019) 2191–2209. doi:10.1007/s00216-019-02241-y.
- [94] M. Holčapek, G. Liebisch, K. Ekroos, Lipidomic Analysis, *Anal. Chem.* 90 (2018) 4249–4257. doi:10.1021/acs.analchem.7b05395.
- [95] J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane, A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES, *J. Biol. Chem.* (1957). <http://www.jbc.org/>.
- [96] E.G. BLIGH, W.J. DYER, A rapid method of total lipid extraction and purification., *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911–917. doi:10.1139/o59-099.
- [97] V. Matyash, G. Liebisch, T. V. Kurzchalia, A. Shevchenko, D. Schwudke, Lipid extraction by methyl-terf-butyl ether for high-throughput lipidomics, in: *J. Lipid Res.*, American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2008: pp. 1137–1146. doi:10.1194/jlr.D700041-JLR200.
- [98] X. Han, R.W. Gross, Shotgun lipidomics: Electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples, *Mass Spectrom. Rev.* 24 (2005) 367–412. doi:10.1002/mas.20023.
- [99] X. Han, K. Yang, R.W. Gross, Multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics and novel strategies for lipidomic analyses, *Mass Spectrom. Rev.* 31 (2012) 134–178. doi:10.1002/mas.20342.
- [100] F.F. Hsu, Mass spectrometry-based shotgun lipidomics – a critical review from the technical point of view, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 6387–6409. doi:10.1007/s00216-018-1252-y.

- [101] K. Eder, Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 671 (1995) 113–131. doi:10.1016/0378-4347(95)00142-6.
- [102] C. Buré, S. Ayciriex, E. Testet, J.M. Schmitter, A single run LC-MS/MS method for phospholipidomics, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 203–213. doi:10.1007/s00216-012-6466-9.
- [103] G. Ventura, M. Bianco, C.D. Calvano, I. Losito, T.R.I. Cataldi, HILIC-ESI-FTMS with All Ion Fragmentation (AIF) Scans as a Tool for Fast Lipidome Investigations, *Molecules.* 25 (2020) 2310. doi:10.3390/molecules25102310.
- [104] J. Lanzini, D. Dargère, A. Regazzetti, A. Tebani, O. Laprèvote, N. Auzeil, Changing in lipid profile induced by the mutation of Foxn1 gene: A lipidomic analysis of Nude mice skin, *Biochimie.* 118 (2015) 234–243. doi:10.1016/j.biochi.2015.09.029.
- [105] J. Petit, A. Wakx, S. Gil, T. Fournier, N. Auzeil, P. Rat, O. Laprèvote, Lipidome-wide disturbances of human placental JEG-3 cells by the presence of MEHP., *Biochimie.* 149 (2018) 1–8. doi:10.1016/j.biochi.2018.03.002.
- [106] J. Ivanisevic, E.J. Want, From samples to insights into metabolism: Uncovering biologically relevant information in LC- HRMS metabolomics data, *Metabolites.* 9 (2019). doi:10.3390/metabo9120308.
- [107] K.M. Hines, J. Herron, L. Xu, Assessment of altered lipid homeostasis by HILIC-ion mobility-mass spectrometry-based lipidomics, *J. Lipid Res.* 58 (2017) 809–819. doi:10.1194/jlr.D074724.
- [108] S.M. Lam, L. Tong, B. Reux, X. Duan, A. Petznick, S.S. Yong, C.B.S. Khee, M.J. Lear, M.R. Wenk, G. Shui, Lipidomic analysis of human tear fluid reveals structure-specific lipid alterations in dry eye syndrome, *J. Lipid Res.* 55 (2014) 299–306. doi:10.1194/jlr.P041780.
- [109] K. Araki-Sasaki, Y. Ohashi, T. Sasabe, K. Hayashi, H. Watanabe, Y. Tano, H. Handa, An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36 (1995) 614–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7534282>.
- [110] G. Repetto, A. del Peso, J.L. Zurita, Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 1125–1131. doi:10.1038/nprot.2008.75.
- [111] S. Ayciriex, A. Regazzetti, M. Gaudin, E. Prost, D. Dargère, F. Massicot, N. Auzeil, O. Laprèvote, Development of a novel method for quantification of sterols and oxysterols by UPLC-ESI-HRMS: Application to a neuroinflammation rat model, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 3049–3059. doi:10.1007/s00216-012-6396-6.
- [112] B. Burla, M. Arita, M. Arita, A.K. Bendt, A. Cazenave-Gassiot, E.A. Dennis, K. Ekroos, X. Han, K. Ikeda, G. Liebisch, M.K. Lin, T.P. Loh, P.J. Meikle, M. Orešič, O. Quehenberger, A. Shevchenko, F. Torta, M.J.O. Wakelam, C.E. Wheelock, M.R. Wenk, MS-based lipidomics of human blood plasma: a community-initiated position paper to develop accepted guidelines., *J. Lipid Res.* 59 (2018) 2001–2017. doi:10.1194/jlr.S087163.
- [113] A. Mehlem, C.E. Hagberg, L. Muhl, U. Eriksson, A. Falkevall, Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease, *Nat. Protoc.* 8 (2013) 1149–1154. doi:10.1038/nprot.2013.055.
- [114] E. Brasnu, F. Brignole-Baudouin, L. Riancho, J.-M. Warnet, C. Baudouin, Comparative

- study on the cytotoxic effects of benzalkonium chloride on the Wong-Kilbourne derivative of Chang conjunctival and IOBA-NHC cell lines., *Mol. Vis.* 14 (2008) 394–402. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18334956><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2268853>.
- [115] E. Warcoin, C. Roubéix, A. Raveu, Hyperosmolarity and Benzalkonium Chloride Differently Stimulate Inflammatory Markers in Conjunctiva-Derived Epithelial Cells in vitro, (2016). doi:10.1159/000448117.
- [116] S.P. Epstein, D. Chen, P.A. Asbell, Evaluation of Biomarkers of Inflammation in Response to Benzalkonium Chloride on Corneal and Conjunctival Epithelial Cells, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 25 (2009) 415–424. doi:10.1089/jop.2008.0140.
- [117] A. Robciuc, T. Hyötyläinen, M. Jauhiainen, J.M. Holopainen, Hyperosmolarity-induced lipid droplet formation depends on ceramide production by neutral sphingomyelinase 2, *J. Lipid Res.* 53 (2012) 2286–2295. doi:10.1194/jlr.M026732.
- [118] B. Kaminska, MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1754 (2005) 253–262. doi:10.1016/j.bbapap.2005.08.017.
- [119] X. Xiao, H. He, Z. Lin, P. Luo, H. He, T. Zhou, Y. Zhou, Z. Liu, Therapeutic effects of epidermal growth factor on benzalkonium chloride-induced dry eye in a mouse model., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53 (2012) 191–7. doi:10.1167/iovs.11-8553.
- [120] M. Lee, K.M. Joo, S. Choi, S.H. Lee, S.Y. Kim, Y.J. Chun, D. Choi, K.M. Lim, Nervonoylceramide (C24:1Cer), a lipid biomarker for ocular irritants released from the 3D reconstructed human cornea-like epithelium, MCTT HCE™, *Toxicol. Vit.* 47 (2018) 94–102. doi:10.1016/j.tiv.2017.11.008.
- [121] R. Claus, M. Dorer, A. Bunck, H. Deigner, Inhibition of Sphingomyelin Hydrolysis: Targeting the Lipid Mediator Ceramide as a Key Regulator of Cellular Fate, *Curr. Med. Chem.* 16 (2009) 1978–2000. doi:10.2174/092986709788682182.
- [122] B.T. Bikman, S.A. Summers, Science in medicine Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism, 121 (2011). doi:10.1172/JCI57144.4222.
- [123] M. Maceyka, S. Spiegel, Sphingolipid metabolites in inflammatory disease, (2014). doi:10.1038/nature13475.
- [124] A. Robciuc, T. Hyötyläinen, M. Jauhiainen, J.M. Holopainen, Ceramides in the Pathophysiology of the Anterior Segment of the Eye, *Curr. Eye Res.* 38 (2013) 1006–1016. doi:10.3109/02713683.2013.810273.
- [125] P.T. Bozza, J.P.B. Viola, Lipid droplets in inflammation and cancer, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 82 (2010) 243–250. doi:10.1016/j.plefa.2010.02.005.
- [126] J. Herron, R.C. Reese, K.A. Tallman, R. Narayanaswamy, N.A. Porter, L. Xu, Identification of environmental quaternary ammonium compounds as direct inhibitors of cholesterol biosynthesis, *Toxicol. Sci.* 151 (2016) 261–270. doi:10.1093/toxsci/kfw041.
- [127] E. Olivier, M. Dutot, A. Regazzetti, D. Dargère, N. Auzeil, O. Laprèvote, P. Rat, Lipid deregulation in UV irradiated skin cells: Role of 25-hydroxycholesterol in keratinocyte differentiation during photoaging, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 169 (2017) 189–197. doi:10.1016/j.jsbmb.2016.05.015.
- [128] C. Garenc, P. Julien, E. Lévy, Oxysterols in biological systems: The gastrointestinal tract,

- liver, vascular wall and central nervous system, *Free Radic. Res.* 44 (2010) 47–73. doi:10.3109/10715760903321804.
- [129] I.M. Larrayoz, J.D. Huang, J.W. Lee, I. Pascual, I.R. Rodríguez, 7-Ketocholesterol-Induced inflammation: Involvement of multiple kinase signaling pathways via NFκB but independently of reactive oxygen species formation, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51 (2010) 4942–4955. doi:10.1167/iovs.09-4854.
- [130] C. Joffre, L. Leclère, B. Buteau, L. Martine, S. Cabaret, L. Malvitte, N. Acar, G. Lizard, A. Bron, C. Creuzot-Garcher, L. Bretillon, Oxysterols induced inflammation and oxidation in primary porcine retinal pigment epithelial cells, *Curr. Eye Res.* 32 (2007) 271–280. doi:10.1080/02713680601187951.
- [131] J.D. Huang, J. Amaral, J.W. Lee, I.R. Rodriguez, 7-Ketocholesterol-induced inflammation signals mostly through the TLR4 receptor both in vitro and in vivo, *PLoS One.* 9 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0100985.

MAGNY, Romain

Une approche moléculaire *in vitro* de la sécheresse oculaire : intérêt de l'analyse lipidomique dans la recherche de marqueurs biologiques d'une pathologie

Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie

Université de Picardie Jules Verne - 2020

Mots clefs : Sécheresse oculaire, analyse lipidomique, chlorure de benzalkonium, hyperosmolarité

La sécheresse oculaire est une pathologie chronique entraînant inconfort et troubles de la vision. Les étiologies sont nombreuses et conduisent à l'entrée dans un cercle vicieux avec instabilité lacrymale, hyperosmolarité et inflammation. Les connaissances sur les mécanismes physiopathologiques restent à explorer afin de définir des cibles thérapeutiques potentielles ou des candidats biomarqueurs. Peu de données sur le remodelage lipidique au cours de la sécheresse oculaire sont disponibles. A partir d'un modèle *in vitro* de cellules cornéennes, cette étude explore l'effet sur le lipidome d'une exposition à un ammonium quaternaire, principal excipient des collyres. Une comparaison avec l'effet d'une hyperosmolarité, phénomène physiopathologique central de la sécheresse oculaire a été effectuée. A cette fin, une analyse lipidomique par UPLC-HRMS-ESI+/- a été réalisée. Celle-ci a mis en évidence des modifications du taux cellulaire des glycérolipides, des glycérophospholipides, des sphingolipides et des stérols. Ces résultats soulignent également des modulations différentes entre les deux expositions. Une accumulation des triglycérides conduisant à la formation de gouttelettes lipidiques a été observée après exposition hyperosmolaire et une diminution du cholestérol après exposition au chlorure de benzalkonium. Ces modulations s'accompagnent également de l'augmentation de l'expression génique d'enzymes impliquées dans la biosynthèse des lipides. Ces résultats montrent l'implication de certains lipides dans le processus qui sous-tend la sécheresse oculaire et leur intérêt dans la recherche de biomarqueurs et de cibles thérapeutiques, ce qui nécessite des études mécanistiques afin d'élucider le rôle de ces lipides.

JURY

Président :

Pr Catherine Demailly-Mullié, Professeur des Universités

Membres :

Dr Françoise Brignole-Baudouin, Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

Pr Olivier Laprévotte, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

Dr Nicolas Auzeil, Maître de Conférence des Universités