



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 17626](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/17626)

**To cite this version :**

Blaauw, Anouk. *Élaboration d'un modèle expérimental de cataracte sénile induite au sélénite de sodium chez le lapin sain.*  
Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2017, 106 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr).

# ÉLABORATION D'UN MODÈLE EXPÉRIMENTAL DE CATARACTE SÉNILE INDUITE AU SÉLÉNITE DE SODIUM CHEZ LE LAPIN SAIN

---

THÈSE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLÔME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**BLAAUW Anouk**

Née, le 23 Février 1990 à PARIS (75)

---

**Directeur de thèse : M. Alain RÉGNIER**

---

## JURY

PRÉSIDENT

**M. Pierre FOURNIÉ**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS

**M. Alain RÉGNIER**

**M. Alain BOUSQUET-MÉLOU**

Professeur Émérite à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITÉ

**M. Éric LACOSTE**

Docteur vétérinaire et directeur scientifique de la société Imavita



Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt  
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Directrice : Madame Isabelle CHMITELIN

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. AUTEFAGE André, *Pathologie chirurgicale*
- Mme CLAUW Martine, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. CONCORDET Didier, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. DELVERDIER Maxence, *Anatomie Pathologique*
- M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*
- M. FRANC Michel, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. MILON Alain, *Microbiologie moléculaire*
- M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. SCHELCHER François, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*
- M. BERTHELOT Xavier, *Pathologie de la Reproduction*
- M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, *Pathologie de la Reproduction*
- M. DUCOS Alain, *Zootchnie*
- M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie des ruminants*
- Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme HAGEN-PICARD, Nicole, *Pathologie de la reproduction*
- M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. LIGNEREUX Yves, *Anatomie*
- M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
- M. PICALET Dominique, *Pathologie infectieuse*
- M. SANS Pierre, *Productions animales*
- Mme TRUMEL Catherine, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. GUERIN Jean-Luc, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme LACROUX Caroline, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*

## PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*  
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

## MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

## MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*  
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*  
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*  
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*  
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*  
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*  
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*  
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*  
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*  
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*  
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*  
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*  
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*  
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

## ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*  
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*  
Mme **SABY-CHABAN Claire**, *Gestion de la santé des troupeaux bovins*

# REMERCIEMENTS

---

**Au président de thèse,**

**À Monsieur le Professeur Pierre FOURNIÉ**

Professeur des Universités  
Praticien hospitalier  
*Ophthalmologie*

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,  
Veuillez trouver ici l'expression de nos remerciements et nos sentiments respectueux.

**À notre jury de thèse,**

**À Monsieur le Professeur Alain RÉGNIER**

Professeur Émérite à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse  
*Ophthalmologie*

Qui a accepté de participer à ce projet et nous a épaulé dans sa réalisation.  
Qu'il soit remercié pour sa patience et pour le soutien qu'il apporte dans son enseignement.

**À Monsieur le Professeur Alain BOUSQUET-MÉLOU**

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse  
*Physiologie et Thérapeutique*

Qui nous a fait l'honneur d'accepter de participer à notre jury de thèse,  
Qu'il soit remercié pour son aide et sa disponibilité.

**À Monsieur le Docteur Éric LACOSTE**

Docteur vétérinaire et directeur scientifique de la société Imavita.

Qui nous a proposé ce sujet et guidé tout au long de sa réalisation.  
Qu'il soit remercié pour son aide, ses conseils et son accueil au sein de la société Imavita.



# SOMMAIRE

---

LISTE DES FIGURES .....	9
LISTE DES TABLEAUX .....	12
LISTE DES ANNEXES.....	13
LISTE DES ABBRÉVIATIONS .....	15
INTRODUCTION.....	17
<b>1 PROPRIÉTÉS DU CRISTALLIN.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 Rappels anatomiques .....</b>	<b>19</b>
1.1.1 Anatomie de l'œil.....	19
1.1.2 Anatomie du cristallin .....	20
<b>1.2 Propriétés biochimiques et physiques du cristallins.....</b>	<b>22</b>
1.2.1 Composition biochimique du cristallin.....	22
1.2.2 Métabolisme du cristallin sain .....	29
1.2.3 Mécanismes de l'accommodation .....	31
<b>1.3 Modifications physiologiques du cristallin liées à l'âge .....</b>	<b>31</b>
<b>2 LA CATARACTE : DESCRIPTION ET ORIGINES .....</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Description de la cataracte .....</b>	<b>33</b>
2.1.1 Généralités.....	33
2.1.2 Âge d'apparition.....	34
2.1.3 Les stades évolutifs .....	34
2.1.4 Les localisations possibles des formes débutantes et immatures .....	37
<b>2.2 Les causes de cataracte .....</b>	<b>39</b>
<b>2.3 Les mécanismes de la cataractogénèse .....</b>	<b>41</b>
2.3.1 Déséquilibre des systèmes antioxydants du cristallin.....	42
2.3.2 Modifications affectant les protéines .....	42
2.3.3 Déséquilibre du système d'élimination des déchets.....	43
2.3.4 Implication des protéines membranaires .....	44
<b>2.4 Traitements de la cataracte .....</b>	<b>44</b>
2.4.1 Traitement chirurgical de la cataracte .....	45
2.4.2 Mesures préventives.....	47

<b>3</b>	<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DES MODÈLES EXPÉRIMENTAUX EXISTANTS DE CATARACTE INDUITE AU SÉLÉNITE DE SODIUM .....</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Généralités concernant le modèle .....</b>	<b>49</b>
<b>3.2</b>	<b>Modèles réalisés chez le rat.....</b>	<b>53</b>
3.2.1	Exemples d'injection sous-cutanée.....	53
3.2.2	Exemple de culture <i>in vitro</i> de cristallins .....	60
<b>3.3</b>	<b>Modèles réalisés chez le lapin .....</b>	<b>62</b>
3.3.1	Passage du modèle du rat au lapin .....	62
3.3.2	Modèle d'injection sous cutanée .....	63
3.3.3	Modèle d'injection intravitréenne .....	63
<b>4</b>	<b>ÉTUDE EXPÉRIMENTALE : ÉLABORATION D'UN MODÈLE EXPÉRIMENTAL DE CATARACTE SÉNILE INDUITE AU SÉLÉNITE DE SODIUM CHEZ LE LAPIN SAIN. ....</b>	<b>70</b>
<b>4.1</b>	<b>Objectifs et problématique.....</b>	<b>71</b>
<b>4.2</b>	<b>Matériel et méthode .....</b>	<b>71</b>
4.2.1	Animaux de l'étude .....	71
4.2.2	Produit utilisé .....	72
4.2.3	Préparation des solutions expérimentales.....	73
4.2.4	Critères retenus pour l'examen ophtalmologique .....	74
<b>4.3</b>	<b>Résultats des phases expérimentales .....</b>	<b>77</b>
4.3.1	Administrations sous-cutanées .....	77
4.3.2	Administrations intravitréennes .....	81
<b>5</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>90</b>
<b>5.1</b>	<b>Choix expérimentaux et limites du modèle.....</b>	<b>90</b>
<b>5.2</b>	<b>Perspectives d'amélioration .....</b>	<b>93</b>
	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>95</b>
	<b>ANNEXES .....</b>	<b>97</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>100</b>

# LISTE DES FIGURES

---

Figure 1. – Coupe sagittale du bulbe de l’œil d’un lapin montrant son organisation générale (Hématoxyline et éosine, x10). Cliché : N. BOURGES-ABELLA. ....	20
Figure 2. – Dessins assistés par ordinateur (DAO) montrant la disposition et les lignes de sutures des fibres cristalliniennes chez le lapin (au dessus) et le chien (en dessous) (Kusak et al., 2004). ....	21
Figure 3. – Micrographie électronique d’un complexe multimérique de cristallines $\alpha$ (coloration négative des protéines avec de l’acétate d’uranyle). La barre indique 10nm (Augusteyn, 2004). ....	23
Figure 4. – Reconstruction en 3 dimensions d’un complexe de 32 sous unités $\alpha$ B (en bleu). Les éléments en rouge montrent la variance tridimensionnelle, et traduisent la variabilité structurale. (a) Vue extérieure, (b) Vue de la cavité interne. La barre indique 10nm (Horwitz et al., 1999).....	24
Figure 5. – Structure des cristallines $\beta/\gamma$ . À gauche, schéma d’un domaine (deux motifs en clé grecque). À droite, reconstruction en 3 dimensions d’un monomère complet (deux domaines) (Slingsby et al. 2013).....	26
Figure 6. – Représentation schématique des jonctions communicantes (Goodenough & Paul, 2003). ....	27
Figure 7. – Aspect clinique de la sclérose nucléaire du cristallin chez un chien (Régnier, 2013-2014). ....	32
Figure 8. – Observation clinique de la cataracte. À gauche : examen à distance montrant une leucocorie unilatérale droite chez un chien ; À droite : examen à la lampe à fente montrant une cataracte nucléaire immature (Régnier).....	33
Figure 9. – À gauche, cataracte immature vue en rétroillumination chez un chien. À droite, cataracte immature avec vision des lignes de suture antérieures (Régnier) .....	34
Figure 10. – À gauche, cataracte mûre chez un Caniche. À droite, cataracte intumescence avec écartement des lignes de suture chez un chien (Régnier) .....	35
Figure 11. – Cataracte hypermûre avec résorption et plis de la capsule antérieure (Régnier)	36
Figure 12. – Cataracte de Morgagni chez un chien (Régnier).....	36

Figure 13. – Classification des cataractes selon leur morphologie sur le cristallin (Slatter, 1981) .....	37
Figure 14. – Cataracte nucléaire avec début de cataracte corticale chez un chien âgé (Régnier).....	37
Figure 15. – Cataracte corticale antérieure développée le long des lignes de suture (Régnier) .....	38
Figure 16. – Illustration simplifiée de la technique de phacoémulsification (Ollivier, ophtalmoveterinaire.com) .....	45
Figure 17. – Exemples d’implants intraoculaires utilisés chez l’animal (Bouhanna, 2007) .....	46
Figure 18. – Aspect des yeux de chiens après chirurgie de la cataracte sans pose d’implant (à gauche) et avec pose d’implant (à droite) (ENVT).....	46
Figure 19. – Observation à la lampe à fente de la mise en place d’une cataracte induite au sélénite de sodium chez le rat. À gauche, cristallin normal. Au centre, stade intermédiaire. À droite, cataracte complètement mise en place (Fris et al., 2006). .....	49
Figure 20. – Mécanisme de formation de la cataracte induite au sélénite de sodium chez le rat (Shearer et al., 1997). .....	51
Figure 21. – Résultats obtenus chez le rat (jeune et adulte), 20 jours après le traitement au sélénite de sodium (Ostadalova et al., 1977). .....	56
Figure 22. – Résultats d’induction de cataracte chez le rat, 21 jours après le traitement au sélénite de sodium, avec traitement ou non au resvératrol (Doganay et al., 2006) .....	59
Figure 23. – Résultats du groupe contrôle, pour l’induction de cataracte chez le lapin, après injection intravitréenne de sélénite de sodium (Abdul Hussein & Alzubaidy, 2014) .....	66
Figure 24. – Résultats du groupe contrôle, pour l’induction de cataracte chez le lapin, après injection intravitréenne de sélénite de sodium (Abdul Hussein, 2015) .....	66
Figure 25. – Résultats du groupe test, pour l’induction de cataracte chez le lapin, après injection intravitréenne de sélénite de sodium (Abdul Hussein & Alzubaidy, 2014) .....	67

Figure 26. – Photographie des animaux inclus dans les études : à gauche Abdul Hussein & Alzubaidy, 2014 ; à droite Abdul Hussein, 2015. ....	68
Figure 27. – Résultats de l'étude menée chez le rat. À gauche : témoin négatif ; À droite : cataracte sénile nucléaire obtenue après administration sous-cutanée de sélénite de sodium. ....	70
Figure 28. – Caractéristiques chimiques du sélénite de sodium utilisé pour les phases expérimentales.....	73
Figure 29. – Système de classification III des opacités du cristallin (Chylack et al., 1993) .....	76
Figure 30. – Voie d'abord pour une injection intravitréenne chez le lapin (Ellegaard Göttingen Minipigs – minipigs.dk).....	81
Figure 31. – Cristallins prélevés sur le lapin n°4, 10 jours après injection intravitréenne. À gauche, cristallin gauche ayant reçu 0,1mL de soluté physiologique. À droite, cristallin droit ayant reçu 0,1mL de sélénite de sodium (0,1mg/mL). ....	83
Figure 32. – Cristallins prélevés sur le lapin n°2, 24 heures après injection intravitréenne. À gauche, cristallin gauche ayant reçu 0,1mL de soluté physiologique. À droite, cristallin droit ayant reçu 0,1mL de sélénite de sodium (10mg/mL). ....	84
Figure 33. – Opacités nucléaires du cristallin, extrait du LOCS III (Chylack et al., 1993). ....	87

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. – Répartition des animaux dans les groupes d'étude (Ostadalova et al., 1977)....	54
Tableau 2. – Répartition des animaux dans les groupes d'étude (Doganay et al., 2006).....	57
Tableau 3. – Échelle d'évaluation de la cataracte (Doganay et al., 2006). .....	58
Tableau 4. – Répartition des cristallins dans les groupes d'étude (Qi et al., 2013).....	61
Tableau 5. – Protocole de l'étude présentée par Abdul Hussein & Alzubaidy (2014).....	64
Tableau 6. – Protocole de l'étude présentée par Abdul Hussein (2015).....	64
Tableau 7. – Protocole de l'étude présentée par Alkader Shakoor & Alzubaidy (2016) .....	65
Tableau 8. – Résultats du groupe contrôle, pour l'induction de cataracte chez le lapin, après injection intravitréenne de sélénite de sodium (Alkader Shakoor & Alzubaidy, 2016) .....	66
Tableau 9. – Résultats du groupe test, pour l'induction de cataracte chez le lapin, après injection intravitréenne de sélénite de sodium (Abdul Hussein, 2015) .....	67
Tableau 10. – Préparation des solutions de sélénite de sodium au cours des phases expérimentales.....	74
Tableau 11. – Répartition des animaux dans les groupes d'étude de la phase 2 et résultats obtenus.....	79
Tableau 12. – Photographies des cristallins des groupes 1 et 3, après dissection. ....	80
Tableau 13. – Protocole anesthésique retenu pour les injections intravitréennes.....	82
Tableau 14. – Cristallins prélevés sur les lapins n°3 et 5, 5 jours après injection intravitréenne. À gauche, cristallins gauche ayant reçu 0,1mL de soluté physiologique. À droite, cristallins droit ayant reçu 0,1mL de sélénite de sodium (1mg/mL).....	85
Tableau 15. – Répartition des animaux dans les groupes d'étude de la phase 4 et résultats obtenus.....	87
Tableau 16. – Résultats des examens rapprochés des individus inclus dans la phase 4, 7 jours après injection intravitréenne de 0,1mL de sélénite de sodium de concentration 1mg/mL. ....	88

## LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. – Déroulement de la phase 1, étape 1 de l'étude expérimentale. ....	97
Annexe 2. – Déroulement de la phase 1, étape 3 de l'étude expérimentale. ....	97
Annexe 3. – Déroulement des injections intravitréennes lors de la phase 3 de l'étude expérimentale. ....	98



# LISTE DES ABBRÉVIATIONS

AMPc : Adénosine Mono Phosphate cyclique  
AQP : Aquaporine  
ATP : Adénosine Tri Phosphate  
Ca : calcium  
Cl : chlore  
DAO : Dessin Assisté par Ordinateur  
DRO : Dérivés Réactifs de l'Oxygène  
GLUT : Glucose Transporter  
GMPc : Guanosine Mono Phosphate cyclique  
GSH : glutathion sous forme réduite  
GSSG : glutathion sous forme oxydée  
Hz : Hertz  
IP<sup>3</sup> : Inositol tri Phosphate  
K : potassium  
kDa : kilo-Dalton  
LOCS : Lens Opacities Classification System  
MIP : Major Intrinsic Protein  
Na : sodium  
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogène  
NZW : New Zealand White  
OCGS : Oxford Cataract Classification and Grading System  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PhD : *Philosophiæ doctor*  
PK/PD : Pharmacocinétique / Pharmacodynamique  
Se : sélénite  
sHSP : small Heat Shock Protein  
SLGT : Sodium-glucose transporter  
UV : Ultra-violets  
WHO : World Health Organization



## INTRODUCTION

La cataracte est une affection oculaire très courante chez l'homme comme chez l'animal. Il s'agit d'ailleurs de la première cause de cécité chez l'homme, avec 17 millions de personnes atteintes dans le monde en 2010, et d'une des causes principales de cécité chez l'animal domestique (le chien, le chat ou encore le cheval). Elle affecte une structure particulière de l'œil : le cristallin, et correspond ainsi à une altération partielle ou totale de sa transparence, conduisant progressivement à une opacification et à une perte de vision. La cataracte peut être déterminée par des causes variables, dont le vieillissement est la principale chez l'homme. Les progrès de la médecine humaine et de la médecine vétérinaire contribuent à mieux connaître sa prévalence.

À l'heure actuelle, la prise en charge médicale de la cataracte comporte des mesures préventives ou symptomatiques censées repousser l'apparition l'opacification du cristallin, voire ralentir son évolution. Ces mesures ne permettent cependant pas la guérison. Chez l'homme et chez l'animal, la chirurgie de la cataracte reste le seul traitement curatif disponible, mais induit un coût non négligeable.

En 2015, une étude sino-américaine a commencé à étudier des possibilités de traitements médicamenteux curatifs de la cataracte (Zhao et al., 2015). Il est apparu alors de plus en plus intéressant de viser à développer des modèles expérimentaux permettant d'étayer cette recherche, et c'est dans cette dynamique que s'inscrit ce travail.

L'objectif de cette étude est de présenter un modèle développé avec la société Imavita afin de mettre en place un protocole d'induction de cataracte par le sélénite de sodium chez le lapin sain. Pour cela, il nous a semblé important au préalable de regrouper les informations concernant une méthode spécifique d'obtention de cataractes expérimentales : l'induction par le sélénite de sodium et leur utilisation en recherche ophtalmologique.

Dans un premier temps, nous décrivons les propriétés anatomiques, biochimiques et physiologiques du cristallin, puis nous nous intéresserons à la pathogénie de la cataracte. Par la suite, nous effectuerons une revue bibliographique des modèles expérimentaux d'intérêt avant d'exposer le déroulement et les résultats de notre étude expérimentale.

# 1 PROPRIÉTÉS DU CRISTALLIN

## 1.1 Rappels anatomiques

### 1.1.1 Anatomie de l'œil

L'œil du lapin correspond approximativement à une sphère dont le diamètre antéro-postérieur est de 16 à 19mm et le grand axe horizontal est de 18 à 20mm. Il est relativement volumineux, et est ainsi très exposé aux traumatismes (particulièrement chez le lapin nain dont les yeux sont très proéminents) (Monnereau et Barthélémy, 2000).

Il présente la même organisation générale que celui des autres Mammifères (cf. Figure 1), et est ainsi délimité par trois tuniques concentriques :

- La **tunique fibreuse**, la plus externe et la plus épaisse, formée d'une partie postérieure opaque, la sclère, et d'une partie antérieure transparente, la cornée. La sclère donne à l'œil adulte sa forme et son volume, tandis que la cornée assure le rôle de protection des structures internes de l'œil.
- La **tunique vasculaire**, intermédiaire, est la tunique nourricière de l'œil. Elle est constituée de deux segments : l'uvée antérieure, qui regroupe le corps ciliaire et l'iris, et l'uvée postérieure, correspondant à la choroïde. Elle est parfois appelée « membrane irido-cilio-choroïdienne ».
- La **tunique « nerveuse »**, la plus interne, composée de la rétine et de ses vaisseaux sanguins.

Ces tuniques délimitent les chambres et les milieux du globe oculaire, nécessaires au bon fonctionnement de l'œil. Il existe trois types de milieux transparents :

- **L'humeur aqueuse**, milieu liquide situé dans la chambre antérieure de l'œil, limitée par la cornée et l'iris. Elle est sécrétée par les procès ciliaires dans la chambre postérieure, c'est-à-dire dans l'espace compris entre l'iris, le cristallin et la zonule ciliaire. Elle gagne ensuite la chambre antérieure via la pupille, avant d'être drainée dans l'angle irido-cornéen.

- Le **corps vitré**, milieu gélatineux situé dans la chambre vitrée du globe oculaire, c'est-à-dire dans l'espace compris entre le cristallin et le fond de l'œil.
- Le **cristallin**, milieu solide, intercalé entre l'iris et la chambre vitrée du globe oculaire.

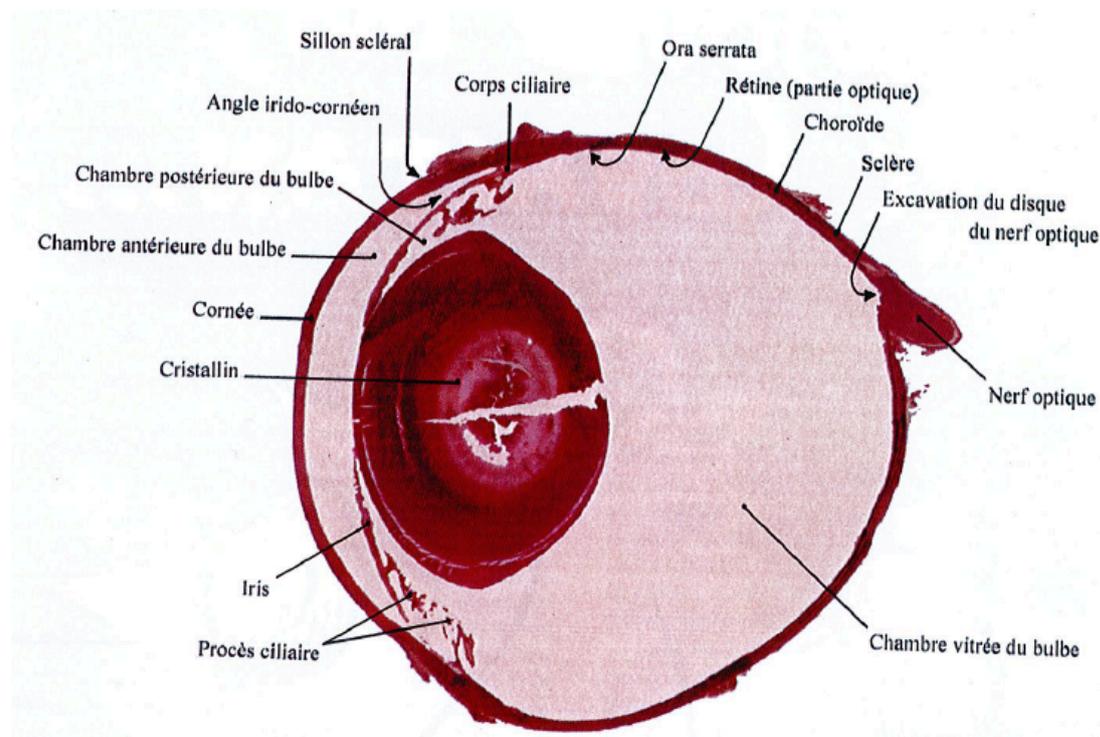


Figure 1. – Coupe sagittale du bulbe de l'œil d'un lapin montrant son organisation générale (Hématoxyline et éosine, x10). Cliché : N. BOURGES-ABELLA.

### 1.1.2 Anatomie du cristallin

La fonction principale du cristallin est liée à sa transparence et à ses propriétés réfractives, lui permettant de focaliser les rayons lumineux pour former une image nette et inversée sur la rétine. Ces caractéristiques reposent sur une architecture interne ne bloquant jamais la lumière, et sur une composition biochimique adaptée.

#### 1.1.2.1 Structure du cristallin

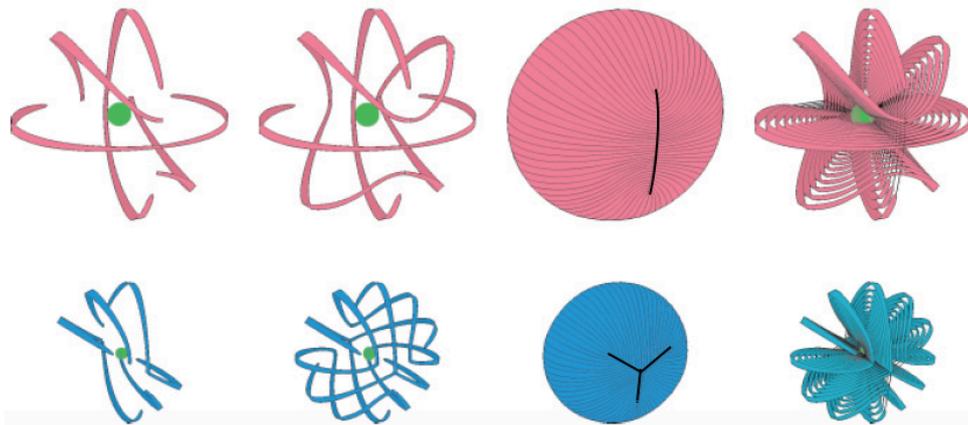
Le cristallin est une lentille biconvexe convergente, avasculaire et complètement transparente d'origine ectodermique, située en avant de la rétine, entre l'iris et la chambre vitrée de l'œil. Il est maintenu en place par de nombreuses fibres ancrées au corps ciliaire : la zonule ciliaire ou zonule de Zinn. Chez le lapin, le cristallin peut atteindre 6 à 9mm, voire 11mm de diamètre à l'âge adulte. Il est plus large que celui de l'homme, et plus sphérique.

Le cristallin est constitué d'une enveloppe élastique divisée en une capsule antérieure tapissée par un épithélium, et une capsule postérieure. Chez le lapin, la capsule antérieure mesure 10 à 25µm d'épaisseur, tandis que la capsule postérieure est plus fine et mesure 4 à 6µm d'épaisseur (Florangeau, 2002).

Il est à noter qu'il n'existe ni protéolyse, ni élimination de cellules au sein du cristallin. Toutes les structures sont conservées depuis leur formation et jusqu'à la mort de l'hôte. Cette particularité anatomique et physiologique permet de rencontrer des éléments d'âges différents à l'intérieur d'une seule structure.

### 1.1.2.2 *Fibres cristalliniennes*

À l'intérieur de l'enveloppe décrite précédemment, de nombreuses fibres cristalliniennes s'organisent en lamelles concentriques régulièrement superposées, avec les fibres les plus âgées au centre, et les plus jeunes en périphérie (Bloemendal et al., 2004). Chez le lapin, ces fibres se rejoignent selon deux lignes de suture, verticales dans le cortex antérieur, et horizontales dans le cortex postérieur. Elles sont aussi appelées rayons du cristallin. Chez les carnivores domestiques, on dénombre trois lignes de suture formant un « Y » (Florangeau, 2002) (cf. Figure 2).



**Figure 2. – Dessins assistés par ordinateur (DAO) montrant la disposition et les lignes de sutures des fibres cristalliniennes chez le lapin (au dessus) et le chien (en dessous) (Kusak et al., 2004).**

Les fibres cristalliniennes résultent de la différenciation spécifique des cellules de l'épithélium cristallinien bordant la face interne de la capsule antérieure. Leur maturation centrifuge s'accompagne de la perte de leur noyau par pycnose, et de la dégradation synchrone des organites intracellulaires (Bassnett, 2002). Ainsi, les fibres cristalliniennes

profondes sont complètement dépourvues d'organites de la synthèse protéique, mais elles abritent dans leur cytoplasme des protéines spécifiques, les cristallines, synthétisées directement sur place par les fibres cristalliniennes corticales et accumulées pendant la différenciation cellulaire. L'organisation cellulaire des fibres et des cellules épithéliales cristalliniennes est importante pour le maintien de la transparence du cristallin, cependant le pouvoir de réfraction est principalement conféré par la forte concentration en protéines spécifiques.

## **1.2 Propriétés biochimiques et physiques du cristallin**

### **1.2.1 Composition biochimique du cristallin**

#### ***1.2.1.1 Généralités***

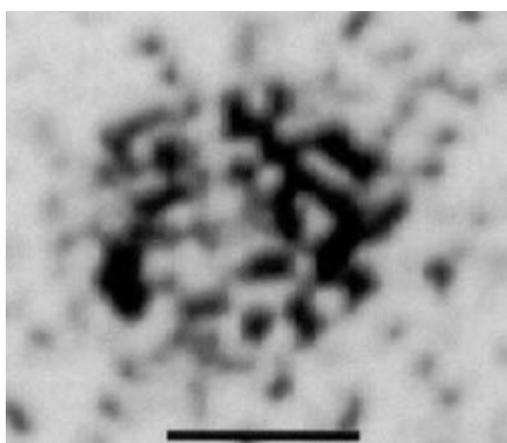
Le cristallin est assez pauvre en eau (65% du poids total), mais possède la proportion de protéines la plus importante de l'organisme (35%), réparties en deux catégories : les protéines solubles et les protéines insolubles. Les protéines solubles, largement majoritaires, sont constituées à 90% par une famille spécifique : les cristallines. La fraction protéique insoluble du cristallin est appelée albuminoïde, sa proportion augmente avec l'âge. D'autres éléments comme des enzymes, des vitamines, des sels minéraux ou encore des oses sont également présents (Gervais, 2007).

#### ***1.2.1.2 Cristallines***

Chez les Mammifères, les cristallines regroupent deux familles majeures : les cristallines  $\alpha$ , et les cristallines  $\beta/\gamma$ . Elles participent au maintien de la structure du cristallin, et sont responsables de sa transparence et de ses propriétés réfractives (Horwitz et al., 1999). Ce sont des protéines synthétisées dans les fibres cristalliniennes au cours du développement. Les trois classes de cristallines sont obtenues par l'expression des gènes dans un ordre spatial et temporel très strict : d'abord les cristallines  $\alpha$ , puis  $\beta$ , et enfin  $\gamma$ . Cette étape de différenciation s'accompagne de la dégradation des organites intracellulaires des fibres cristalliniennes profondes, avec en particulier la disparition de tous les acteurs de la synthèse protéique. En conséquence, il n'existe pas de renouvellement des protéines, et donc des cristallines dans le noyau du cristallin (Bloemendal et al., 2004).

- Les cristallines  $\alpha$  (alpha)

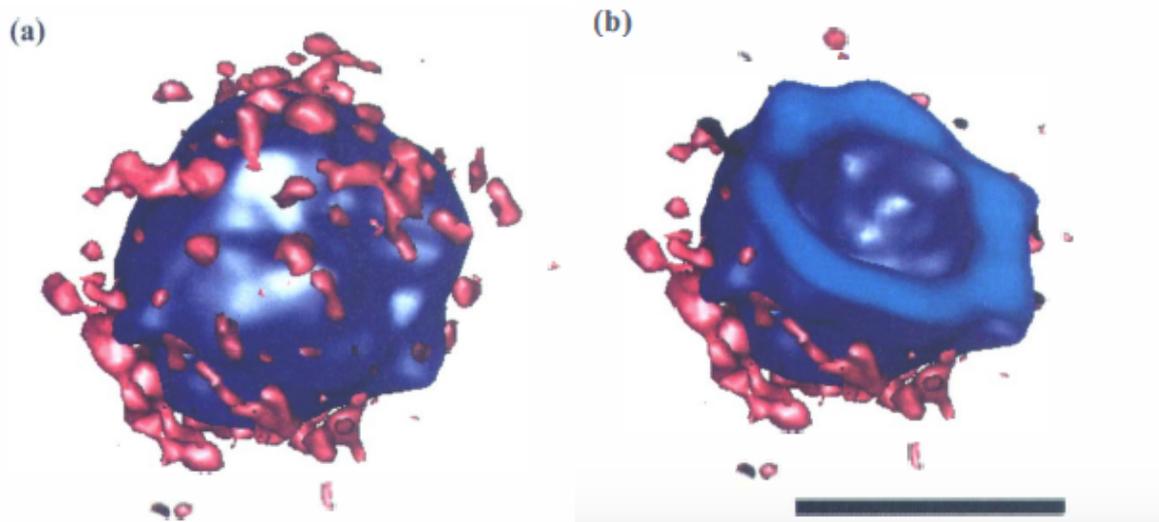
Chez les Mammifères, les cristallines  $\alpha$  représentent 50% de la masse protéique du cristallin, et sont codées par deux gènes,  $\alpha A$  et  $\alpha B$ , qui expriment 57% d'homologie. Les protéines obtenues possèdent un domaine très conservé chez tous les membres des sHSP (*small Heat Shock Proteins*), marquant l'appartenance des cristallines  $\alpha$  à cette famille (Horwitz et al., 1992). Les formes  $\alpha A$  et  $\alpha B$  sont présentes aussi bien dans les fibres que dans les cellules épithéliales cristalliniennes. Par ailleurs les  $\alpha B$  se retrouvent aussi dans la rétine, et d'autres tissus non cristalliniens (cerveau, cœur, muscles) (Bloemendal et al., 2004).



**Figure 3. – Micrographie électronique d'un complexe multimérique de cristallines  $\alpha$  (coloration négative des protéines avec de l'acétate d'uranyle). La barre indique 10nm (Augusteyn, 2004).**

Les cristallines  $\alpha$  se présentent sous la forme de complexes multimériques hétérogènes de haut poids moléculaire (600 à 800 kDa en moyenne) constitués de 30 à 45 sous-unités  $\alpha A$  et  $\alpha B$  (cf. Figure 3, ci-dessus) (Horwitz et al., 1999). Des études ont montré que ces complexes ont une stabilité optimale avec un ratio de trois  $\alpha A$  pour une  $\alpha B$ . Cependant, on peut observer des modifications structurales stables si la proportion de monomères  $\alpha B$  augmente. Il existe donc plusieurs formes d'hybrides  $\alpha A/\alpha B$  suivant la nature de la sous-unité dominante (Thomson & Augusteyn, 1989). Par ailleurs,  $\alpha A$  et  $\alpha B$  occupent des places équivalentes et interchangeables au sein des multimères, ce qui suggère une structure quaternaire symétrique, variable et dynamique, au sein de laquelle des échanges de sous-unités surviennent aisément, corrélés à la température. Des études en cryomicroscopie électronique utilisant des cristallines  $\alpha$  recombinées (multimères de 32 sous-unités  $\alpha B$ ) ont montré que la structure quaternaire s'apparente à un micelle de 11 nm de diamètre, avec

une écorce protéique de 3nm d'épaisseur entourant une cavité centrale (cf. Figure 4) (Horwitz et al., 1999). À l'heure actuelle, seule la structure de complexes recombinaisonnés est accessible. En effet, l'hétérogénéité et la variabilité sont bénéfiques pour la fonction des cristallines  $\alpha$ , mais rendent difficile l'étude de la structure. Cette hétérogénéité est d'autant plus importante que les cristallines  $\alpha$  subissent en permanence des modifications post-traductionnelles.



**Figure 4. – Reconstruction en 3 dimensions d'un complexe de 32 sous unités  $\alpha$ B (en bleu). Les éléments en rouge montrent la variance tridimensionnelle, et traduisent la variabilité structurale.**

**(a) Vue extérieure, (b) Vue de la cavité interne. La barre indique 10nm (Horwitz et al., 1999).**

Les modifications post-traductionnelles évoquées plus haut sont physiologiques, et sont responsables de l'augmentation du poids moléculaire des cristallines  $\alpha$  à mesure que l'on approche du centre du cristallin. Combinées à la compression des cellules, elles participent à l'établissement de très hautes concentrations protéiques vers le noyau, nécessaire à l'obtention d'un indice de réfraction optimal (Augusteyn, 2004).

En 1992, l'équipe de Horwitz découvre que les cristallines  $\alpha$  possèdent une activité chaperonne : elles interagissent avec les protéines dénaturées, non natives, afin d'empêcher leur agrégation et leur précipitation, à l'origine de l'opacification du cristallin. En effet, au cours du vieillissement, il survient une conversion progressive des protéines solubles natives en une version dénaturée, non native et insoluble, touchant principalement les cristallines  $\beta$  et  $\gamma$ . Dans la mesure où il n'existe aucun renouvellement protéique dans les fibres

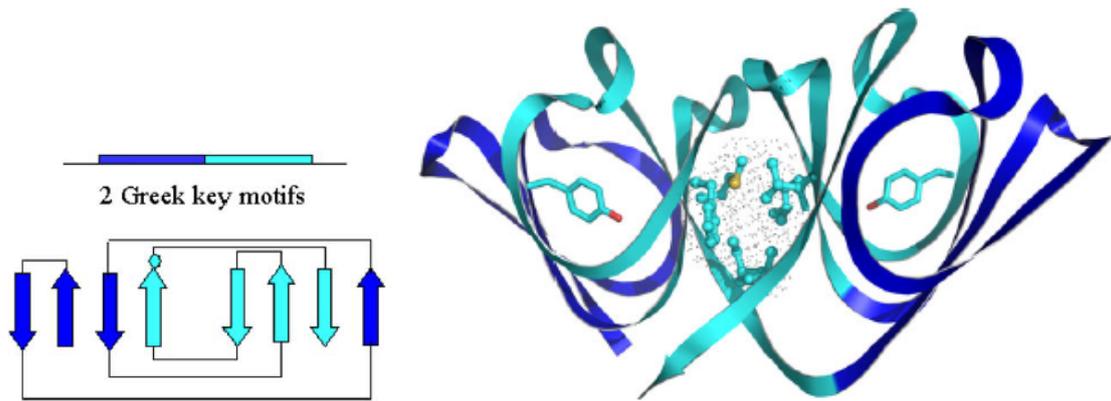
cristalliniennes profondes, cette activité chaperonne est fondamentale dans le maintien de la stabilité des protéines du noyau cristallin pendant toute la vie de l'hôte (Horwitz et al., 1992). Des études complémentaires soulignent qu'une fois le stock de cristallines  $\alpha$  épuisé dans les fibres cristalliniennes profondes, la concentration en protéines dénaturées de façon permanente ne cesse d'augmenter jusqu'au moment où la précipitation est telle qu'une cataracte nucléaire survient (Bloemendal et al., 2004). Par ailleurs, il apparaît que le rôle protecteur des cristallines  $\alpha$  s'étend également aux cellules épithéliales du cristallin. Inhibant l'apoptose de ces dernières, les cristallines  $\alpha$  empêchent la formation de cataractes corticales. Cet effet est annulé lorsque tout le stock de cristallines  $\alpha$  est épuisé (Nahomi et al., 2012).

Les cristallines  $\alpha$  possèdent ainsi deux fonctions distinctes et indispensables au sein du cristallin : un rôle structural, assurant la transparence et le maintien d'un indice de réfraction adéquat, et un rôle fonctionnel, protecteur. Elles sont ainsi un très bon exemple du concept de « gene sharing » (Horwitz et al., 1992).

- Les cristallines  $\beta/\gamma$  (bêta / gamma)

Chez les Mammifères, il existe 6 gènes codant pour les cristallines  $\beta$ . Les protéines obtenues sont divisées en deux classes : basiques ( $\beta B1$ ,  $\beta B2$ ,  $\beta B3$ ) et acides ( $\beta A3/A1$ , et  $\beta A4$ ). Les cristallines  $\gamma$  sont traduites à partir de 7 gènes ( $\gamma A$ ,  $\gamma B$ ,  $\gamma C$ ,  $\gamma D$ ,  $\gamma E$ ,  $\gamma F$  et  $\gamma S$ ). Les protéines de cette superfamille sont exprimées dans les fibres et dans les cellules épithéliales cristalliniennes, mais aussi au sein de la rétine (Andley et al., 2007).

Les cristallines  $\beta$  et  $\gamma$  ont une structure tertiaire similaire correspondant à quatre motifs en clé grecque organisés en deux domaines, et reliés par un peptide de connexion appelé « linker ». Outre son extrême stabilité, cette structure en clé grecque permet d'atténuer les effets des radiations UV et participe à protéger le cristallin contre la photo-oxydation liée à l'âge. Les cristallines  $\gamma$  restent sous cette forme monomérique de 21 kDa, tandis que les cristallines  $\beta$  s'assemblent en oligomères de 150 à 200 kDa (cf. Figure 5). Les complexes de cristallines  $\beta$  peuvent s'échanger des monomères, ce qui suggère que ce ne sont pas des structures statiques, mais qu'elles sont dans un état d'équilibre réversible (Hejtmancik et al., 2015).



**Figure 5. – Structure des cristallines  $\beta/\gamma$ . À gauche, schéma d'un domaine (deux motifs en clé grecque). À droite, reconstruction en 3 dimensions d'un monomère complet (deux domaines) (Slingsby et al. 2013).**

La structure des cristallines  $\gamma$  est particulièrement adaptée pour les régions à haute densité moléculaire, ce sont donc les éléments majoritaires dans le noyau du cristallin. Elles contribuent ainsi à la très haute concentration protéique de cette zone, correspondant ainsi à la zone la plus déshydratée et la plus dense du cristallin.

Il existe peu d'information concernant la fonction de ces protéines dans le cristallin. Certaines études suggèrent une implication en tant que protéine de protection induite en cas de stress critique au sein de la rétine, ou un rôle dans le remodelage vasculaire de l'œil (Andley et al., 2007). D'autres suggèrent un rôle de stabilisation des structures oligomériques comme l'actine, voire d'autres cristallines (Slingsby et al., 2013).

### **1.2.1.3 Protéines membranaires**

Les protéines membranaires représentent environ 2% du volume protéique du cristallin et assurent différents rôles. Certaines, comme les N-cadhérines ou les calpactines, sont respectivement impliquées dans l'adhésion cellule/cellule ou cellule/cytosquelette. D'autres, sont impliquées dans les échanges intercellulaires et l'équilibre des fluides, fondamentaux pour le maintien de la transparence. On en distingue plusieurs types, dont la répartition et la nature varient en fonction de leur localisation dans le cristallin.

- Les transporteurs d'eau

Les cellules épithéliales possèdent des AQP1, des aquaporines très efficaces pour le transport de l'eau, tandis que dans les fibres cristalliniennes, on rencontre plutôt des AQP0, anciennement appelées MIP (Major Intrinsic Proteins) (Kistler, 1989). Les AQP0 sont dix fois plus lentes que les AQP1 en tant que transporteur, mais sont présentes en plus grand nombre (elles comptent pour plus de 50% des protéines membranaires des fibres cristalliniennes). Elles réalisent ainsi 80% du transport de l'eau dans les fibres cristalliniennes.

Les mouvements d'eau occasionnés par les aquaporines permettent au cristallin de fonctionner en tant qu'élément optique. D'une part, ils contribuent à diminuer les aberrations sphériques grâce au maintien du gradient de l'indice de réfraction, et d'autre part ils génèrent les changements de volume nécessaires pour l'accommodation du cristallin (Schey et al., 2014).

- Les jonctions communicantes

Le cristallin étant une structure avasculaire, les communications cellulaires et les échanges métaboliques sont facilités grâce à un réseau étendu de jonctions communicantes ou « gap junctions ». Il s'agit d'oligomères de protéines spécifiques appelées connexines, formant un canal intercellulaire. Les jonctions communicantes sont perméables aux éléments de moins de 1 kDa et autorisent ainsi les échanges d'ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ), de seconds messagers (AMPC, GMPC, inositol tri phosphate  $\text{IP}^3$ ) ou de petits métabolites (glutathion) (cf. Figure 6).

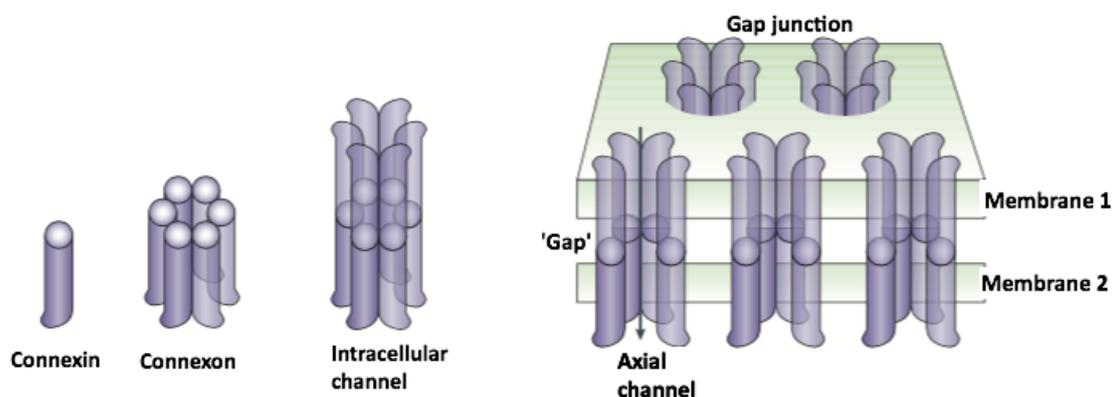


Figure 6. – Représentation schématique des jonctions communicantes (Goodenough & Paul, 2003).

Trois types de jonctions communicantes ont été identifiés dans le cristallin, en fonction de la nature des connexines qui les composent : les jonctions gap A1 (GJA1), constituées des connexines Cx43 sont situées sur les membranes des cellules épithéliales, les jonctions gap A8 (GJA8), constituées des connexines Cx50 sont situées sur les membranes des cellules épithéliales et des fibres cristalliniennes corticales, et les jonctions gap A3 (GJA3), constituées des connexines Cx46 sont localisées sur les membranes des fibres cristalliniennes nucléaires.

Les jonctions communicantes assurent la microcirculation interne des métabolites depuis le cortex jusqu'au noyau du cristallin. Celle-ci permet ainsi d'alimenter les cellules du cristallin pour leur fonctionnement, d'éliminer les déchets potentiellement toxiques et réalise les mouvements d'ions nécessaires au maintien des potentiels de repos membranaires. Les fibres cristalliniennes se comportent ainsi comme un syncytium fonctionnel (Hejtmancik et al., 2015 ; Bertoud & Beyer, 2009).

- Autres protéines membranaires

Les métabolites échangés via les jonctions communicantes sont d'abord apportés aux cellules épithéliales cristalliniennes via de nombreux transporteurs spécialisés. On rencontre ainsi des canaux ioniques passifs (canaux  $K^+$ , canaux  $Cl^-$ , échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$ ), des pompes ioniques ATPasiques actives (pompe  $Na^+/K^+$  ATPasique, pompe calcique ATPasique), ou encore des transporteurs GLUT1 pour l'import de glucose dans le cristallin.

Les fibres cristalliniennes expriment moins de transporteurs à la surface de leur membrane. On trouve des transporteurs de glucose (GLUT3 sur les fibres corticales ou SGLT2, un transporteur de glucose couplé au sodium, sur les fibres nucléaires), des transporteurs d'acides aminés impliqués dans la synthèse du glutathion (cystéine, glycine, glutamate) et quelques canaux ioniques passifs (co-transport  $K^+/Cl^-$  ou  $Na^+/K^+/2Cl^-$ ). Par ailleurs, les fibres cristalliniennes sont un des rares types cellulaires à ne pas disposer de pompe  $Na^+/K^+$  ATPasiques (Mathias et al., 2010).

#### **1.2.1.4 Autres éléments**

La présence de quelques autres éléments est également à noter au sein du cristallin. On trouve quelques composés organiques comme les lipides, essentiellement représentés par le cholestérol et les phospholipides, le glutathion, très impliqué dans le transport du dioxygène et la détoxification des cellules, ou encore l'ATP.

Quelques vitamines ont également été isolées dans le cristallin : les vitamines A, B1, B2, PP et C. La teneur en vitamine C diminue avec l'âge et lors de cataracte.

### **1.2.2 Métabolisme du cristallin sain**

#### **1.2.2.1 Métabolisme énergétique**

Comme toutes les cellules de l'organisme, les cellules cristalliniennes ont besoin d'énergie pour fonctionner. Toutefois, le métabolisme énergétique du cristallin est soumis à un certain nombre d'exigences : celles d'une structure avasculaire qui puise ses nutriments dans l'humeur aqueuse et les relaie par un intense réseau de jonctions communicantes, et celles d'une structure où une grande partie des cellules est dépourvue d'organites intracellulaires, en particulier les mitochondries.

L'énergie (sous forme d'ATP) n'est produite qu'à partir du glucose qui entre dans les cellules par diffusion simple à partir de l'humeur aqueuse. Ensuite, plusieurs voies métaboliques sont empruntées, conditionnées par le matériel enzymatique existant dans les cellules. Dans l'épithélium cristallinien, les cellules possèdent encore des mitochondries et sont ainsi capables de réaliser le cycle de Krebs. Cette voie métabolique est très efficace, produisant 30% de l'énergie requise par le cristallin tout en ne consommant que 3% du glucose disponible. À l'inverse, les fibres cristalliniennes nucléaires ne disposent plus de leurs organites intracellulaires, la voie métabolique privilégiée est alors la glycolyse (voie d'Embden-Meyerhof-Parnas) qui fournit 2/3 de l'énergie. Une autre voie, celle des pentoses phosphate (aérobie et extra mitochondriale) fournit 10 à 20% de l'énergie sous forme d'ATP ainsi que du pouvoir réducteur (NADPH<sub>2</sub>). On a donc un métabolisme aérobie en région corticale du cristallin, et un métabolisme anaérobie en région nucléaire.

L'énergie est ensuite utilisée pour les processus de croissance du cristallin, le phénomène d'accommodation, le maintien des équilibres électrolytiques grâce au fonctionnement des pompes ATPasiques, ou encore la synthèse protéique en périphérie du cristallin (Chartier, 2009 ; Hejtmancik et al., 2015).

### **1.2.2.2 Systèmes antioxydants**

Le cristallin est un milieu réduit où il existe un équilibre entre facteurs pro-oxydants et systèmes de défense antioxydants. Les situations de stress oxydatif, correspondant à un déséquilibre de cette balance en faveur de l'oxydation du milieu, ont été incriminées dans certaines affections oculaires comme la cataracte. En effet, les modifications oxydatives touchant les cristallines entraînent leur agrégation qui est à la base de l'opacification donnant naissance à la cataracte. La principale source de stress oxydatif du cristallin provient de l'exposition aux rayons ultra-violets (UV) et est liée à la production de radicaux libres très réactifs qui en découle.

L'élément antioxydant principal du cristallin est le glutathion (GSH), un polypeptide constitué de glycine, de cystéine et d'acide glutamique. Étant présent en grande majorité sous forme réduite, le GSH interagit ainsi avec les radicaux libres et permet de maintenir l'intégrité des cellules cristalliniennes. La forte teneur en GSH est maintenue par la glutathion réductase et par le pouvoir réducteur généré par la voie des pentoses phosphates. Chez le lapin, le stock de GSH est complètement renouvelé toutes les 48h. D'autres éléments jouent un rôle antioxydant : les vitamines C et E, les caroténoïdes apportés par l'alimentation, et d'autres enzymes (superoxyde dismutase, catalase). Par ailleurs, le sélénium semble avoir une importance dans les mécanismes de protection contre les radicaux libres. Cependant, en 2003, l'équipe de Nabekura a montré expérimentalement qu'une grande quantité de sélénium dans le cristallin était liée à l'apparition de cataracte. Cela peut probablement s'expliquer par le pouvoir fortement oxydant de cet élément sur les groupements sulfhydriles retrouvés notamment sur les cristallines.

Ces défenses sont complétées par des systèmes de réparation des éventuels dégâts causés par un stress oxydatif trop important, avec en particulier l'activité chaperonne des cristallines  $\alpha$  décrite précédemment (Chartier, 2009 ; Brennan et al., 2012).

### 1.2.3 Mécanismes de l'accommodation

L'accommodation est le processus permettant à l'œil de s'adapter de la vision de loin à la vision de près afin de garder une image focalisée sur la rétine. En effet le cristallin est relié au muscle ciliaire par l'intermédiaire de la zonule de Zinn, et toute modification de tension de ce muscle entraîne une modification du rayon de courbure du cristallin. Ainsi, pour s'adapter à la vision de près, le muscle ciliaire se contracte, entraînant un relâchement de la tension exercée sur la zonule avec pour conséquence un bombement du cristallin lié à son élasticité naturelle. À l'inverse, le muscle ciliaire se relâche et le cristallin s'aplatit lors du passage de la vision de près à la vision de loin (on parle de désaccommodation). La distance entre le point le plus éloigné vu sans accommoder (*punctum remotum*) et le point le plus proche vu sans accommoder (*punctum proximum*) correspond au parcours accommodatif. Lorsque cette distance est convertie en dioptries, on parle de pouvoir d'accommodation.

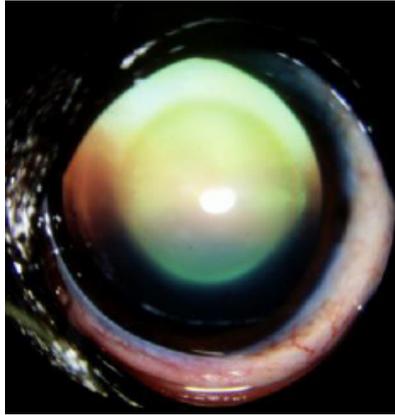
Chez l'homme, la capacité d'accommodation est principalement liée à la capacité de déformation du cristallin, tandis que chez le lapin, le cristallin est trop rigide pour autoriser les modifications de rayon de courbure. L'accommodation est permise par le léger déplacement antéro-postérieur du cristallin qui permet ainsi de replacer l'image sur la rétine (Lebas, 2008).

## 1.3 Modifications physiologiques du cristallin liées à l'âge

- Sclérose nucléaire

La sclérose nucléaire est une modification du cristallin qui découle de sa croissance continue. Les fibres du cortex profond sont progressivement comprimées vers le noyau, qui augmente alors de taille tout en augmentant de densité. Cela se manifeste cliniquement par l'apparition bilatérale d'une zone centrale ronde d'aspect blanc-bleuté (cf. Figure 7). Elle peut survenir dès l'âge de 5-7 ans chez le chien ou le chat, mais affecte principalement les individus âgés, aussi bien chez les animaux que chez l'homme.

Cette modification physiologique peut être confondue avec la cataracte nucléaire mais contrairement à cette dernière, elle n'entraîne pas de perte de vision et ne nécessite donc aucun traitement (Régnier, 2013-2014).



**Figure 7. – Aspect clinique de la sclérose nucléaire du cristallin chez un chien (Régnier, 2013-2014).**

Chez l'homme, la sclérose nucléaire est souvent associée à la presbytie. En effet, la densification du cristallin réduit sa flexibilité et sa capacité de désaccommodation, rendant difficile la mise au point sur les objets situés à faible distance de l'observateur.

- Jaunissement du cristallin

Les cristallines subissent des modifications post-traductionnelles au cours de la vie de l'hôte. On observe en particulier des phénomènes de glycation qui conduisent à la formation de chromophores bruns fluorescents. L'accumulation de ces produits dans le noyau du cristallin conduit à une coloration jaune ou brune. Cela ne conduit pas à une perte de vision, mais altère la perception des couleurs (Michael & Bron, 2011).

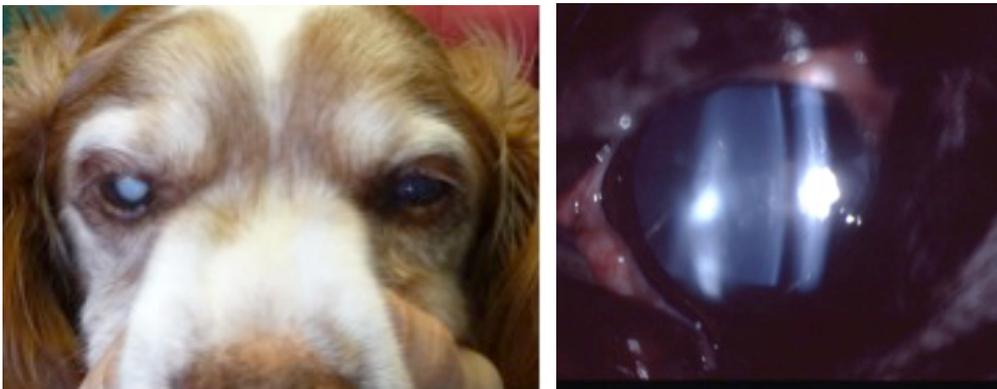
## 2 LA CATARACTE : DESCRIPTION ET ORIGINES

### 2.1 Description de la cataracte

#### 2.1.1 Généralités

Chez l'homme comme chez l'animal, la cataracte est définie par toute opacification suffisamment dense et étendue pour entraîner la perte totale ou partielle de la transparence du cristallin. Ce dernier devient blanc et opaque, ce qui conduit à l'altération de la vision. La cataracte est ainsi la première cause de cécité dans le monde, avec 17 millions de personnes atteintes en 2010.

Lors de l'examen clinique (cf. Figure 8), l'inspection à distance permet de noter la présence d'opacités blanches dans l'aire pupillaire, on parle de leucocorie. L'examen à la lampe à fente et l'examen du fond d'œil permettent quant à eux de localiser plus précisément la position de ces opacités dans le cristallin (Régnier, 2013-2014).



**Figure 8. – Observation clinique de la cataracte. À gauche : examen à distance montrant une leucocorie unilatérale droite chez un chien ; À droite : examen à la lampe à fente montrant une cataracte nucléaire immature (Régnier).**

La classification des cataractes peut retenir différents critères, comme l'âge d'apparition ou le stade d'évolution de la maladie, vus ci-dessous. La dichotomie la plus simple consiste à séparer les cataractes congénitales (héréditaires) et les cataractes acquises, mais on peut également établir des classifications morphologiques ou encore étiologiques. Par ailleurs, ces critères étant additifs, on peut avoir recours à l'utilisation de plusieurs d'entre eux pour décrire une cataracte.

### 2.1.2 Âge d'apparition

La cataracte peut se manifester à des âges très différents, on distingue ainsi :

- La **cataracte congénitale**, présente à la naissance
- La **cataracte juvénile**, qui apparaît chez le chien avant l'âge de 3 ans ou chez le lapin de 5 à 9 semaines. Elle est plus rare chez l'homme.
- La **cataracte de l'adulte**
- La **cataracte sénile**, qui apparaît après 8 ans chez le chien, après 5 ans chez le lapin, et à partir de 65 ans chez l'homme.

### 2.1.3 Les stades évolutifs

À partir de leur apparition, les opacités cristalliniennes peuvent rester stationnaires ou évoluer progressivement vers des stades plus étendus. La durée d'évolution est imprévisible, toutefois la majorité des cataractes se mettent en place sur plusieurs mois à plusieurs années. On recense différents stades évolutifs :

- **Cataracte débutante (incipiente)** : quelques opacités éparses, occupant moins de 15% du cristallin, ne modifiant pas la vision (Adkins & Hendrix, 2005)
- **Cataracte immature ou incomplète (cf. Figure 9)** : opalescence d'étendue très variable (d'une faible portion à l'ensemble des masses cristalliniennes). La vision est donc plus ou moins diminuée selon l'ampleur de la cataracte. Le reflet du fond d'œil est cependant toujours visible en ophtalmoscopie directe et indirecte.

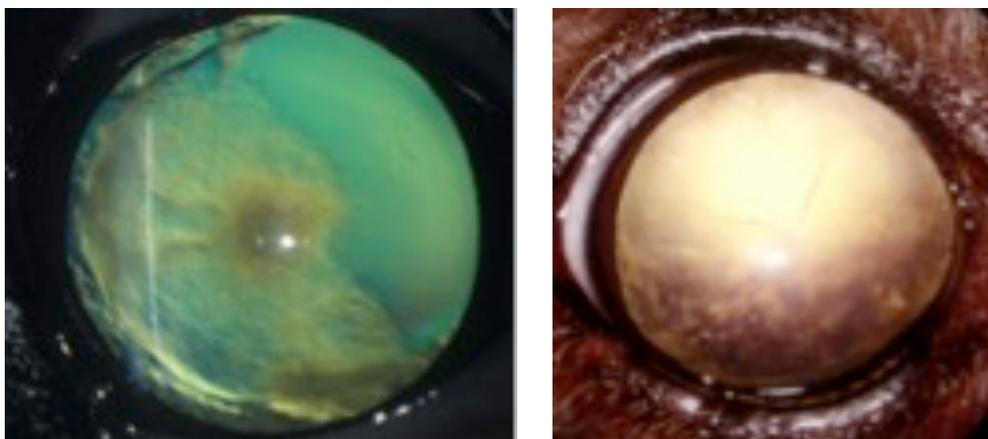
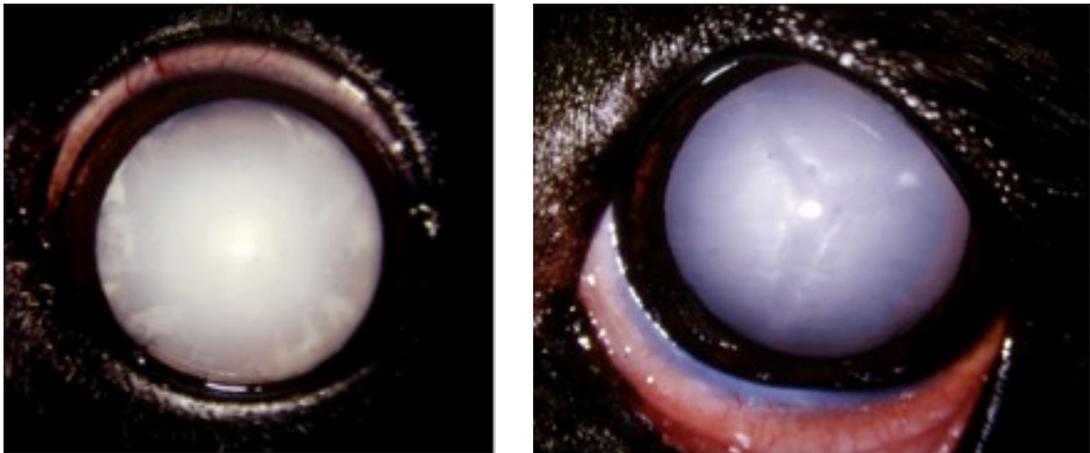


Figure 9. – À gauche, cataracte immature vue en rétroillumination chez un chien. À droite, cataracte immature avec vision des lignes de suture antérieures (Régnier)

- **Cataracte mûre ou totale (cf. Figure 10)** : le cristallin est totalement blanc et opaque, et la vision est perdue. Par ailleurs, le reflet du fond d'œil n'est plus visible. Les cataractes mûres s'accompagnant d'une augmentation de volume, par imbibition du cristallin, sont qualifiées de **cataractes intumescents** (cf. Figure 10). Le transfert d'eau dans le cristallin est lié au pouvoir osmotique généré par les protéines cristalliniennes dégradées. Le cristallin de taille augmentée accroît son contact avec la face postérieure de l'iris, créant un bloc pupillaire qui freine le passage de l'humeur aqueuse de la chambre postérieure à la chambre antérieure. Ce type de cataracte est rapidement associé à une diminution des fonctions visuelles (Andjelic et al., 2015). Les cataractes intumescents peuvent également être à l'origine de glaucomes secondaires à angle fermé.



**Figure 10. – À gauche, cataracte mûre chez un Caniche. À droite, cataracte intumescence avec écartement des lignes de suture chez un chien (Régnier)**

- **Cataracte hypermûre (cf. Figure 11)** : la plupart des cataractes non traitées à temps évoluent vers ce stade suivant. Une cataracte mûre peut ainsi se résorber partiellement et se transformer en cataracte hypermûre. Des zones de cristallin peuvent redevenir transparentes du fait de la résorption cristallinienne, mais elle s'accompagne de la libération de protéines cristalliniennes qui déclenche une réaction immunitaire locale responsable d'une uvéite. On parle d'uvéite phako-antigénique (Régner, 2013-2014).

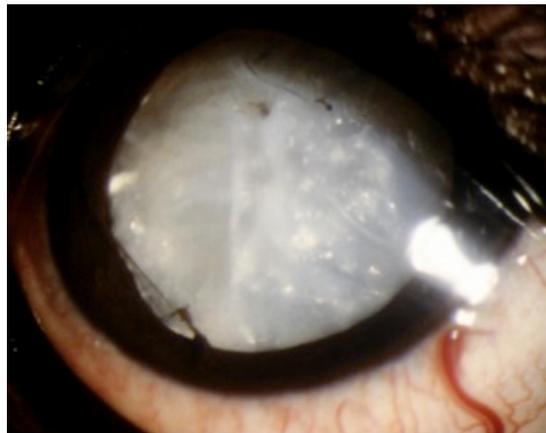


Figure 11. – Cataracte hypermûre avec résorption et plis de la capsule antérieure (Régner)

- **Cataracte de Morgagni (cf. Figure 12)** : il s'agit du stade ultime d'évolution d'une cataracte hypermûre. Suite à la liquéfaction complète du cortex cristallinien, celui-ci revêt une texture gélatineuse et blanche. Le noyau se dépose alors au fond du sac capsulaire, voire se liquéfie aussi dans les cas les plus extrêmes (Patel & Sahu, 2016).

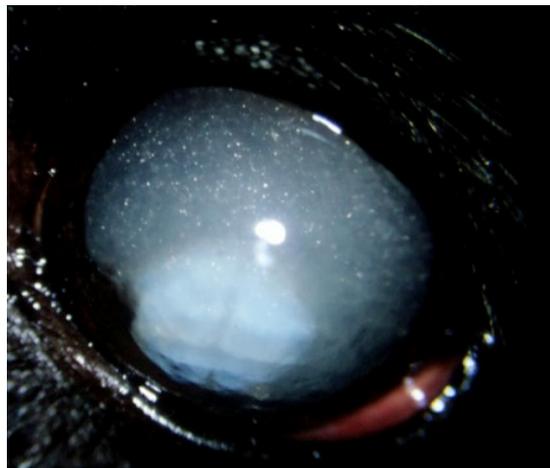


Figure 12. – Cataracte de Morgagni chez un chien (Régner)

## 2.1.4 Les localisations possibles des formes débutantes et immatures

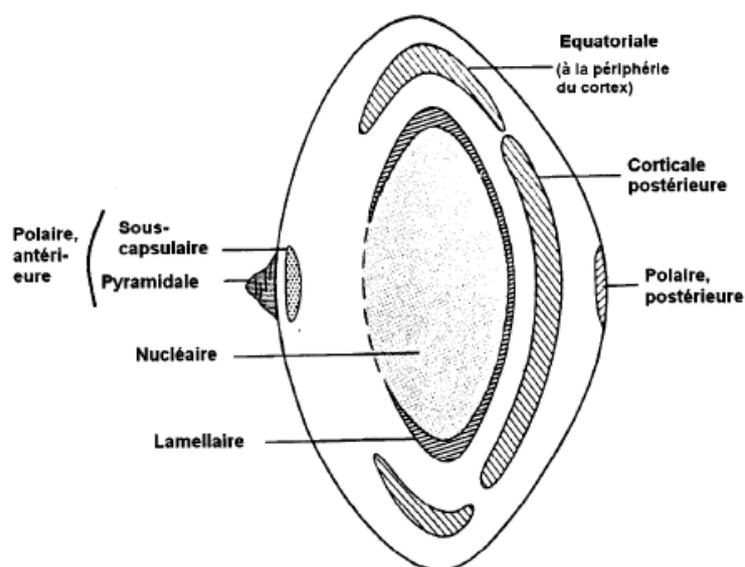


Figure 13. – Classification des cataractes selon leur morphologie sur le cristallin (Slatter, 1981)

L'examen biomicroscopique du cristallin, réalisé avec une lampe à fente, apporte des informations plus précises que l'examen à distance de l'œil. Lors d'opacification partielle du cristallin, l'observation de la répartition des opacités permet alors de définir plusieurs types morphologiques de cataractes, décrits par Albert & Jakobiec en 2000 (cf. Figure 13) :

- **Cataracte nucléaire (cf. Figure 14)** : opacification localisée dans le noyau du cristallin, typique du vieillissement. Elle altère principalement la vision de loin, toutefois, sa mise en place étant lente, de nombreuses années peuvent s'écouler avant de créer une gêne.

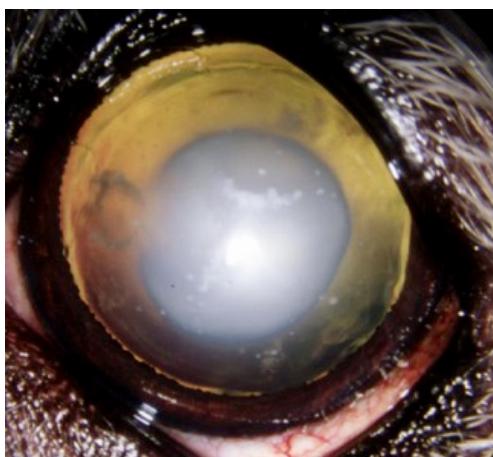
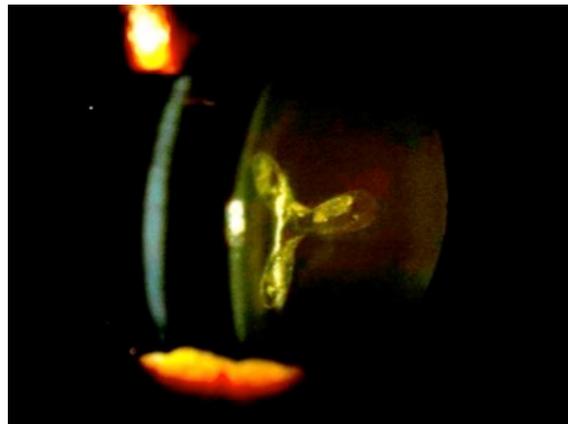


Figure 14. – Cataracte nucléaire avec début de cataracte corticale chez un chien âgé (Régner)

- **Cataracte corticale (cf. Figure 15)** : opacifications du cortex cristallinien, liées à des modifications de l'hydratation de cette zone. La formation de fissures et de vacuoles entre les fibres cristalliniennes provoque la diffusion de la lumière dans l'œil et peut troubler la vision si elles atteignent l'axe optique. Les diabétiques sont les individus les plus à risque pour ce type de cataracte.



**Figure 15. – Cataracte corticale antérieure développée le long des lignes de suture (Régner)**

- **Cataracte sous capsulaire postérieure** : opacifications qui débutent sous la capsule postérieure (à l'arrière du cristallin). Elles peuvent être typiques du vieillissement cristallinien et apparaître progressivement, ou au contraire être secondaires à des complications ou des traitements médicamenteux, et se développer plus rapidement.
- **Cataracte sous capsulaire antérieure** : opacifications observées sous la surface de la capsule antérieure du cristallin. Généralement formée suite à la migration de cellules inflammatoires depuis l'épithélium cristallinien.
- **Cataracte polaire ou capsulaire** : opacifications localisées sur la capsule cristallinienne, au niveau du pôle antérieur ou postérieur. Cas de la cataracte génétique des Retrievers et Labradors (cataracte polaire postérieure)

Quelques types morphologiques particuliers peuvent également être décrits, comme la cataracte lamellaire qui correspond à une opacification du pourtour du noyau, souvent congénitale, ou encore la cataracte suturale, où les zones d'opacification suivent les zones de suture des fibres cristalliniennes. Tous ces types morphologiques peuvent apparaître séparément ou s'additionner chez un même individu (Régner 2013-2014 ; Zarour, 2016).

## 2.2 Les causes de cataracte

Tout processus susceptible de modifier le métabolisme du cristallin et de désorganiser son architecture cellulaire est susceptible d'avoir un effet cataractogène (Régnier, 2013-2014). L'étude de ces processus permet ainsi d'établir une classification étiologique des cataractes, détaillée ci-après.

- Cataracte congénitale

La cataracte congénitale est une anomalie du développement embryonnaire du cristallin, qui peut avoir une origine héréditaire, ou être la conséquence d'infections prénatales ou de troubles métaboliques. Cette forme de cataracte est présente dès la naissance, généralement bilatérale, et peut coexister avec d'autres malformations oculaires (microphthalmie, nystagmus).

Il existe le cas particulier des lapins acrobates, observés dans les années 1960 par Letard. Ces animaux d'aspect normal au repos présentaient des troubles locomoteurs importants, avec un déplacement quasiment à la verticale, sur les antérieurs. Ces défauts locomoteurs étaient associés à des troubles oculaires telles que des cataractes bilatérales, des luxations complètes du cristallin, voire de la cécité. L'origine de cette anomalie est génétique, toutefois la souche de lapins malades a aujourd'hui disparu, et aucun autre cas n'a été observé depuis ceux de Letard (Floranceau, 2002).

- Cataracte héréditaire

La cataracte héréditaire peut prendre la forme d'une cataracte congénitale, juvénile ou de l'adulte, suivant son moment d'apparition. Généralement bilatérale, elle présente cependant une évolution asymétrique d'un œil à l'autre. À l'origine on note des modifications corticales qui gagnent progressivement le noyau. La vitesse d'évolution vers une cataracte totale est variable.

- Cataracte dégénérative, liée à l'âge

La cataracte dégénérative, aussi appelée cataracte « sénile » est principalement liée au vieillissement du cristallin. D'une part les réserves en cristallines  $\alpha$  s'épuisent, et ne

peuvent plus jouer leur rôle de chaperonnes auprès des autres protéines cristalliniennes, et d'autre part, les capacités de défenses antioxydantes sont diminuées. Sous l'action des radicaux libres, les protéines forment alors des agrégats insolubles, ce qui conduit à l'opacification du cristallin, à la cataracte, et lors de cataracte totale, à la cécité. Au vieillissement physiologique s'ajoutent des facteurs de risque multiples tels que l'exposition aux UV.

Le plus souvent bilatérale, elle peut cependant affecter l'un ou l'autre des yeux indépendamment, et se manifeste le plus souvent par une cataracte nucléaire. Elle peut survenir chez l'homme à partir de 65 ans, chez le chien à partir de 8 ans ou encore chez le lapin à partir de 5 ans. Il s'agit de la cause la plus fréquente de survenue de cataracte.

- Cataracte traumatique

La cataracte traumatique est consécutive à une contusion (traumatisme non perforant) ou un traumatisme oculaire perforant. Le traumatisme perturbe l'agencement des fibres cristalliniennes, à l'origine de l'opacification du cristallin. Il peut s'écouler un certain temps entre le traumatisme et l'apparition de la cataracte. Elles peuvent survenir à tout âge et sont le plus souvent unilatérales (Arti, 2015).

- Cataractes post-inflammatoires

Il s'agit par exemple de complications d'uvéites chroniques, la cataracte étant l'une des complications les plus fréquemment associées à cette affection oculaire. Les opacifications se situent plutôt en région antérieure, en zone sous capsulaire équatoriale du cristallin, et peuvent être uni- ou bilatérales. Les cataractes post-inflammatoires sont généralement le résultat de la diffusion à travers la capsule antérieure du cristallin de médiateurs de l'inflammation (lymphocytes T, macrophages et polynucléaires). Associée à une altération des échanges métaboliques entre l'humeur aqueuse et le cristallin, cette migration peut conduire à la dégénérescence des fibres cristalliniennes, et à terme à l'apparition d'opacités (Gilger et al., 1999 ; Sapienza et al., 2000 ; Arti, 2015).

- Cataractes métaboliques

La cataracte métabolique résulte de la modification de la composition chimique du cristallin, en particulier de sa composition en eau. L'exemple le plus répandu est celui lié au diabète sucré. La cataracte apparaît comme la complication oculaire la plus fréquemment rencontrée chez les humains avec un diabète de type 2 (prévalence de 65,7% chez les diabétiques de type 2 (Raman et al., 2010)), ainsi que chez les chiens affectés par ce trouble métabolique (deux chiens diabétiques sur trois présentent une cataracte). Elle est nettement plus rare chez le chat ou chez le lapin.

La cataracte diabétique se traduit par une opacification bilatérale du cristallin, résultant de l'accumulation de sucres à fort pouvoir osmotique (sorbitol et fructose) dans les fibres cristalliniennes. L'appel d'eau induit par la présence de ces sucres entraîne la dégénérescence des fibres, et conduit à l'opacification du cristallin (Pollreisz & Schmidt-Erfurth, 2010).

- Cataracte toxique, cataracte iatrogène

Certains produits toxiques et certains médicaments peuvent causer l'apparition d'une cataracte bilatérale. Suivant le produit incriminé, les opacités sont de localisation variable, et sont par ailleurs associées à la formation de vacuoles. Généralement, l'opalescence disparaît lorsque le produit est retiré. Chez le lapin par exemple, l'application locale de pommades ou collyres contenant des corticostéroïdes peut être responsable d'une cataracte secondaire (Floranceau, 2002). Chez le chien, les exemples les plus typiques concernent le naphthalène et la chlorpromazine (Arti, 2015).

## **2.3 Les mécanismes de la cataractogenèse**

Certains mécanismes pathogéniques apparaissent assez compréhensibles en regard de l'étiologie. On comprend ainsi qu'une cataracte traumatique tire son origine de la désorganisation des fibres cristalliniennes suite au choc, une cataracte inflammatoire est le résultat de la dégénérescence des fibres cristalliniennes suite à la migration de médiateurs de l'inflammation ou encore une cataracte diabétique (métabolique) est étroitement liée au pouvoir osmotique généré par l'élévation de concentration en glucose dans le cristallin.

Toutefois dans le cas des cataractes séniles qui nous intéressent particulièrement dans cette étude, plusieurs mécanismes peuvent être associés en amont de l'opacification du cristallin.

### **2.3.1 Déséquilibre des systèmes antioxydants du cristallin**

Il a été établi précédemment que le cristallin est un milieu réduit où il existe un équilibre entre facteurs pro-oxydants et systèmes de défense antioxydants. En effet, des molécules oxydantes comme les Dérivés Réactifs de l'Oxygène (DRO) sont produites en permanence par les cellules cristalliniennes, sous l'influence de facteurs endogènes et exogènes tels que l'exposition aux UV. La source endogène principale des DRO correspond à une voie détournée de la chaîne de transport des électrons. La formation de ces molécules oxydantes est contrebalancée par les systèmes de défense antioxydants présents dans le cristallin, détaillés précédemment, afin de préserver l'intégrité et la transparence du cristallin au cours de la vie de l'hôte (Brennan et al., 2012).

Lors du vieillissement de l'œil, l'efficacité des systèmes antioxydants et la capacité du cristallin à piéger les DRO diminuent. En effet avec l'âge, on observe une diminution linéaire de la concentration en glutathion réduit (GSH), avec parallèlement une augmentation du glutathion oxydé (GSSG), ainsi qu'une perte progressive des autres systèmes antioxydants comme les vitamines C et E ou encore une inactivation des enzymes spécifiques (glutathion réductase, superoxyde dismutase, catalase). Le déséquilibre dû à l'accumulation des éléments oxydants au détriment des systèmes antioxydants crée une situation de stress oxydatif au sein du cristallin. Les protéines cristalliniennes sont ainsi plus exposées au risque d'oxydation, et sont plus volontiers sujettes aux modifications, décrites ci-après (Michael & Bron, 2011).

### **2.3.2 Modifications affectant les protéines**

Tout d'abord, il est important de rappeler que les protéines subissent tout au long de la vie de l'hôte des modifications post-traductionnelles physiologiques, les protéines cristalliniennes ne font pas exception. Concernant les cristallines, on compte ainsi les phénomènes de glycation conduisant à la formation de chromophores bruns, les déaminations, ou encore les phosphorylations. Ces phénomènes sont à l'origine de changements structuraux susceptibles de modifier les interactions entre cristallines, et leur

solubilité. Ces phénomènes ne sont pas les seuls à l'origine de la cataracte, mais semblent y contribuer (Bloemendal et al., 2004).

Quant aux dommages oxydatifs subis par les cristallines évoqués précédemment, ils sont à la fois structuraux et fonctionnels. D'une part l'oxydation modifie les résidus exprimés sur les cristallines, voire produit des défauts de repliement dans les structures tertiaires de ces protéines. Ces changements perturbent ainsi les interactions de courte portée entre les cristallines. Il se forme alors des agrégats de haut poids moléculaire, résistants à la dégradation, et nettement moins solubles que les cristallines d'origine. La transition vers des éléments insolubles dans le cristallin induit la formation de zones d'opacité, et la cataracte se met en place progressivement. Dans le cas particulier des cristallines  $\alpha$ , les modifications touchant la structure tertiaire peuvent conduire à une perte de leur activité chaperonne. Ne disposant plus de la conformation adéquate, la liaison aux protéines dénaturées ne peut plus se faire, ce qui augmente encore le nombre d'éléments insolubles dans le cristallin (Berthoud & Beyer, 2009 ; Michael & Bron, 2011 ; Sreelakshmi & Abraham, 2016).

Il est à noter que les modifications affectant les protéines peuvent survenir suite à une mutation génétique, avec les mêmes conséquences sur la conformation des protéines cristalliniennes ou sur l'activité chaperonne des cristallines  $\alpha$ . Ce phénomène est le mécanisme pathogénique à l'origine des cataractes congénitales.

À mesure de l'évolution de la cataracte, les processus décrits jusqu'à présent s'accroissent : déséquilibre de l'environnement oxydo-réducteur, modification des interactions entre les cristallines, agrégation et insolubilisation des protéines, jusqu'à la formation des opacités.

### **2.3.3 Déséquilibre du système d'élimination des déchets**

La voie de dégradation ubiquitine-dépendante est impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires, en particulier via l'élimination des protéines endommagées ou des déchets cellulaires qui en découlent. Dans le cristallin, il a été montré que l'ubiquitylation se fait sélectivement sur les protéines oxydées et dénaturées, plutôt que sur leurs formes natives, et cible les protéines endommagées avant leur agrégation en complexes de haut poids moléculaire. La voie ubiquitine permet donc au cristallin d'éliminer les déchets générés par les dégâts oxydatifs mentionnés précédemment.

De nombreux troubles, parmi lesquels la cataracte, ont été associés à un dysfonctionnement de la voie ubiquitine. Ainsi, chez les individus âgés, on observe une diminution de l'activité de la voie ubiquitine, qui conduit à une accumulation des déchets oxydatifs et participe à l'agrégation des protéines dénaturées (Shang & Taylor, 2004 ; Coux & Piechaczyk, 2000).

### **2.3.4 Implication des protéines membranaires**

Les jonctions communicantes élaborent des canaux transmembranaires qui facilitent les communications et les échanges métaboliques entre les cellules du cristallin. Ces structures sont perméables à divers éléments dont le poids moléculaire n'excède pas 1 kDa. Elles ont ainsi un rôle important dans le maintien de l'état réduit des cellules cristalliniennes, en favorisant le passage de molécules et ions dédiés à cette tâche ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ , GSH). Les connexines constituant les jonctions communicantes sont des protéines qui subissent les attaques oxydatives de la même manière que les cristallines. Il en résulte des canaux moins fonctionnels, ne pouvant plus assurer la communication et la perméabilité intercellulaires, ainsi que l'élimination des déchets métaboliques (Berthoud & Beyer, 2009).

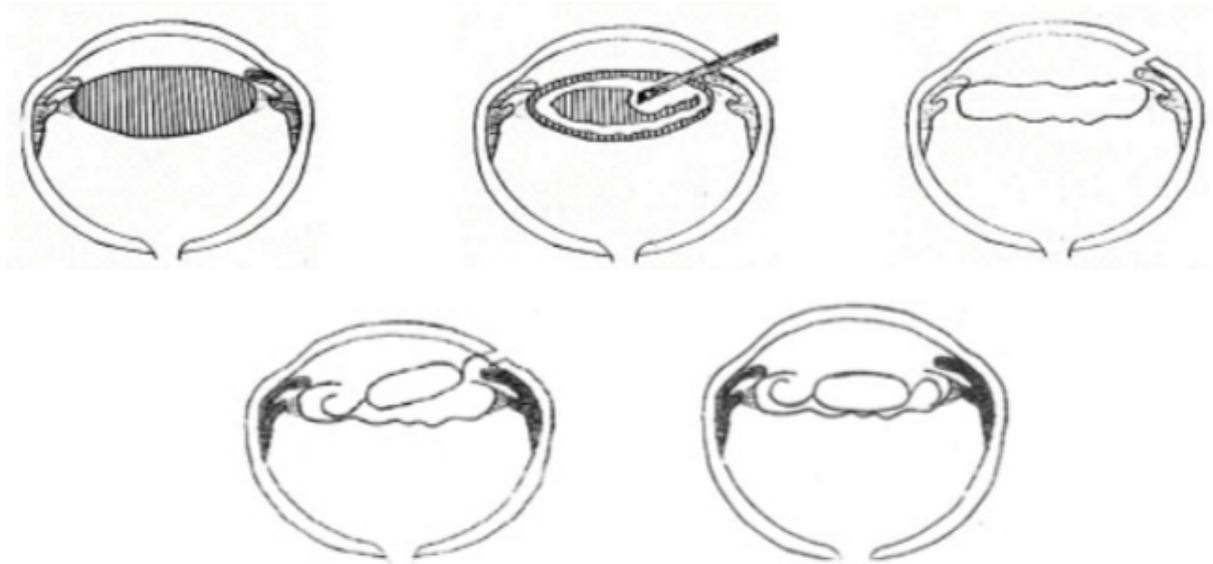
Par ailleurs, la membrane du cristallin est équipée de pompes ioniques ATPasiques (pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , pompe calcique) et de canaux ioniques passifs (échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ) permettant de réguler le passage des ions, avec en particulier une sortie de sodium et calcium, et une accumulation de potassium permanentes. De la même manière, en situation de stress oxydatif, les pompes et canaux ioniques ont un fonctionnement altéré, ce qui conduit à une progressive augmentation des concentrations en sodium et calcium intracellulaires. Cette situation participe à l'agrégation et la dénaturation de protéines, et ainsi à l'opacification.

## **2.4 Traitements de la cataracte**

À l'heure actuelle, le retrait chirurgical des masses cristalliniennes opacifiées et leur remplacement par un implant intracristallinien constituent le seul traitement effectif de la cataracte. Chez le chien, cette opération s'est banalisée et est devenue la technique de référence, et chez l'homme, il s'agit de l'acte chirurgical le plus pratiqué. Cependant, des mesures de prévention hygiéno-diététiques peuvent être envisagées afin de retarder l'apparition de la cataracte, ou ralentir son évolution une fois apparue.

### 2.4.1 Traitement chirurgical de la cataracte

Actuellement, la chirurgie de la cataracte se fait essentiellement par phacoémulsification. Chez l'homme comme chez l'animal, la phacoémulsification du cristallin est la méthode de référence dans les pays industrialisés. Cette intervention, illustrée en Figure 16, est pratiquée sous anesthésie générale chez l'animal, tandis que chez l'homme, elle peut être menée sous anesthésie générale ou locale selon les patients.

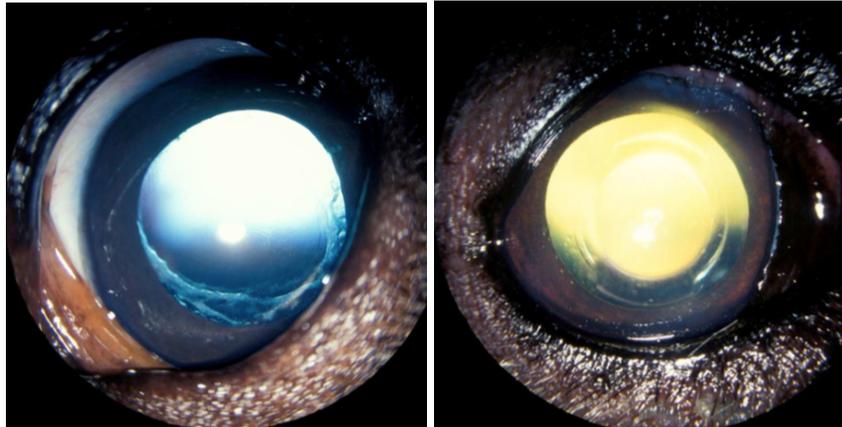


**Figure 16. – Illustration simplifiée de la technique de phacoémulsification (Ollivier, [ophtalmovetinaire.com](http://ophtalmovetinaire.com))**

Une petite incision de 2 à 3 mm est réalisée sur la cornée pour permettre le passage d'une sonde produisant des vibrations à une fréquence 40 000 Hz. Le cristallin est alors fragmenté à l'intérieur de sa capsule et extrait par la même sonde en utilisant une technique d'irrigation-aspiration. Lorsque tous les débris ont été retirés, un implant intraoculaire peut-être inséré dans la capsule cristallinienne laissée en place, permettant ainsi de corriger le défaut d'acuité (hypermétropie) induit par le retrait du cristallin (cf. Figure 17). Si cette étape est systématiquement réalisée chez l'homme, certains animaux ne reçoivent pas nécessairement d'implant (cf. Figure 18). Ces animaux ne seront plus aveugles du fait du retrait du cristallin opaque, mais auront une vision trouble, restant compatible avec la vie de l'animal, on parle d'animaux aphake.



**Figure 17. – Exemples d’implants intraoculaires utilisés chez l’animal (Bouhanna, 2007)**



**Figure 18. – Aspect des yeux de chiens après chirurgie de la cataracte sans pose d’implant (à gauche) et avec pose d’implant (à droite) (ENVT)**

Dans la mesure où les réactions inflammatoires sont nettement plus marquées chez les animaux, une préparation médicale est nécessaire. Un traitement anti-inflammatoire par collyre et pommade est donc réalisé dans les semaines qui précèdent la chirurgie. Ce traitement doit être poursuivi à l’issue de la chirurgie, et est complété par une antibiothérapie visant à réduire le risque infectieux. Chez l’homme, la prise en charge médicamenteuse peut inclure une antibioprophylaxie dans les situations où le risque infectieux est élevé. En post-opératoire, les soins reposent de la même manière sur la gestion de l’inflammation et de l’infection.

Si le pourcentage de réussite de la phacoémulsification dépasse les 90% chez l’homme et chez l’animal, il existe toujours un risque qui ne doit pas être négligé. Les échecs peuvent être liés à plusieurs types de complications : inflammation oculaire (généralement contrôlée), glaucome (augmentation de la pression oculaire), ou encore cataracte secondaire (opacification de la capsule postérieure laissée en place). L’éventualité de ces complications explique la nécessité d’un suivi post-opératoire régulier (ENVT ; Bouhanna, 2007).

## 2.4.2 Mesures préventives

Les mécanismes de la cataractogenèse décrits précédemment, mettent en lumière un dénominateur commun dans la formation de la cataracte sénile : le stress oxydatif. L'intérêt d'identifier un facteur de risque principal dans une affection si répandue permet ainsi de développer des stratégies de prévention ou de ralentissement de l'évolution de la maladie par la suite. Dès 1995, l'équipe de Varma avait déjà montré les bénéfices des antioxydants apportés par complémentation dans la prévention contre la cataracte, en particulier dans le cas des vitamines C et E (Sreelakshmi & Abraham, 2016 ; Varma, 1995).

Depuis, d'autres antioxydants ont été identifiés dans l'alimentation, en particulier dans les fruits et les légumes comme l'acide ascorbique (vitamine C) présent dans de nombreux fruits, la vitamine E contenue dans les noix, amandes ou noisettes, ou encore les caroténoïdes (lutéine et zéaxanthine), présents majoritairement dans les épinards et le chou. Chez l'animal, certains de ces aliments ou compléments alimentaires peuvent aussi être utilisés à des fins de prévention contre la cataracte, en prenant garde à d'éventuelles toxicités alimentaires.

\*\*\*

La cataracte est donc une modification du cristallin dont l'incidence touche de plus en plus de personnes et d'animaux. Le vieillissement de la population et les progrès en termes de médecine (humaine ou vétérinaire) contribuent par ailleurs à l'augmentation de l'incidence des cataractes séniles, et la chirurgie, seul traitement disponible, représente un coût non négligeable. Malgré l'absence actuelle de traitement médicamenteux curatif jusqu'à présent, certaines stratégies de prévention ou de ralentissement de l'évolution de cette affection ont toutefois pu être développées, en particulier pour les cataractes séniles, dont la pathogénie fait intervenir le stress oxydatif.

Ainsi en 2015, une étude sino-américaine a ouvert des perspectives de recherche vers un traitement médicamenteux curatif de la cataracte. Si cette étude a été réalisée sur des animaux atteints de cataracte sénile spontanée, il apparaît intéressant de développer un modèle expérimental reproductible afin de poursuivre plus facilement la recherche dans ce domaine.

La suite de cette étude s'intéresse aux modèles expérimentaux de cataracte utilisant le sélénite de sodium pour l'induction, établis jusqu'à présent.

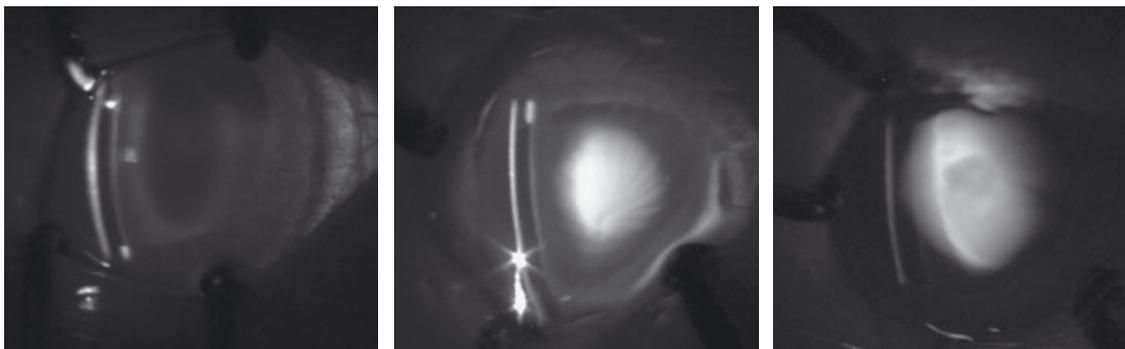
\*\*\*

### 3 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE DES MODÈLES EXPÉRIMENTAUX EXISTANTS DE CATARACTE INDUITE AU SÉLÉNITE DE SODIUM

#### 3.1 Généralités concernant le modèle

- Origine du modèle

C'est en 1977 qu'Ostadalova, Babicky et Obenberger décrivent pour la première fois la capacité du sélénite de sodium à induire une cataracte (cf. Figure 19). En effet, ils montrent qu'une injection unique de sélénite de sodium chez des jeunes rats de 10 jours peut induire une cataracte nucléaire permanente ou intermittente suivant la dose reçue. Ils mettent également en évidence que pour une dose équivalente, les rats adultes ne subissent pas d'effet cataractogène, mais présentent en revanche une plus grande mortalité suite à l'injection (Ostadalova et al., 1977).



**Figure 19. – Observation à la lampe à fente de la mise en place d'une cataracte induite au sélénite de sodium chez le rat. À gauche, cristallin normal. Au centre, stade intermédiaire. À droite, cataracte complètement mise en place (Fris et al., 2006).**

Le sélénium (Se) est un oligo-élément essentiel pour l'homme, les animaux et les bactéries. À de faibles concentrations, il fonctionne dans l'organisme comme antioxydant, mais à de plus fortes concentrations, il devient toxique du fait de sa capacité à induire un stress oxydatif. Le sélénite de sodium est un sel existant sous forme de solide hygroscopique, incolore, anhydre de formule  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  et de masse molaire égale à 172,94 g/mol, ou penta-hydraté de formule  $\text{Na}_2\text{Se}_3(\text{H}_2\text{O})_5$ . Il s'agit du dérivé du sélénium soluble dans l'eau le plus courant (Shearer et al., 1997). Ce composé est excrété dans les urines et les fèces, et nécessite donc de prendre des précautions quant à la manipulation et l'élimination des déchets (Kyselova, 2010).

Depuis la découverte de l'activité cataractogène du sélénite de sodium par l'équipe d'Ostadalova, de nombreux scientifiques se sont intéressés à ce modèle *in vivo* de cataracte, dans le but d'élucider les mécanismes qui y sont impliqués. Dans le modèle consensuel qui a été élaboré, la cataracte est induite par une injection sous-cutanée unique de 19 à 30  $\mu\text{mol/kg}$  (soit 3,29 à 5,19  $\text{mg/kg}$ ) de sélénite de sodium, chez de jeunes rats de 10 jours, c'est-à-dire avant la fin de la période critique de maturation du cristallin. Une cataracte nucléaire, bilatérale se met alors en place en 4 à 6 jours.

- Mécanisme de cataractogenèse induite par le sélénite de sodium

Plusieurs auteurs ont montré que le sélénite de sodium agit sur le cristallin en produisant entre autres un stress oxydatif important dans les cellules. Une séquence de processus a ainsi été identifiée dans la mise en place de la cataracte induite par le sélénite de sodium.

Avant toute opacification évidente du cristallin, des changements métaboliques s'opèrent dans les cellules épithéliales. Les conséquences précoces du stress oxydatif incluent un taux de différenciation cellulaire diminué, une moindre synthèse de l'ADN, combinée à une augmentation de sa dégradation, ou encore une accentuation de la mort des cellules épithéliales, en lien avec la défaillance des protéines du cytosquelette, en particulier de l'alpha-spectrine (Shearer et al. 1997).

Parmi les changements métaboliques, on peut également noter une diminution d'environ 30% du stock de glutathion réduit (GSH), et une perte importante de pouvoir réducteur (NADPH). Cette perte serait liée soit à une interaction directe du sélénite de sodium sur le GSH, soit à une augmentation de la dégradation de GSH couplée à un défaut de synthèse. Il en résulte une exacerbation de la situation de stress oxydatif (Russell et al., 1984 ; Fris et al., 2006).

Par ailleurs, la cataracte est généralement associée à un dérèglement de l'homéostasie calcique. Cependant dans ce modèle, l'augmentation du calcium est localisée au noyau et ne semble pas associée à une modification globale de la perméabilité du cristallin pour d'autres éléments (Na, K, eau). Ici, l'accumulation de calcium serait liée d'une part à l'inhibition des pompes calciques ATPasiques, et d'autre part à une altération des membranes qui

acquièrent alors une perméabilité sélective pour cet ion. Enfin, il est à noter que le dérèglement de l'homéostasie calcique dans le cristallin semble représenter un événement intermédiaire essentiel dans la séquence de formation de la cataracte, plutôt qu'un « symptôme » général de la toxicité du sélénite de sodium (Shearer & David, 1982).

Une conséquence directe et importante de l'augmentation de calcium dans le cristallin est l'activation d'une enzyme protéolytique, la calpaïne II ou m-calpaïne, qui conduit au clivage de protéines et à la formation d'agrégats insolubles de haut poids moléculaire. La fraction insoluble néoformée est essentiellement constituée de cristallines  $\alpha$  et  $\beta$  et tronquées, et de cristallines  $\gamma$  intactes, co-précipitées avec l'ensemble. Par ailleurs, le clivage réalisé sur les cristallines  $\alpha$  provoque un changement conformationnel qui leur fait perdre leur activité chaperonne, augmentant ainsi la proportion de protéines dénaturées incorporées à la fraction insoluble. C'est l'accumulation d'éléments insolubles qui est alors à l'origine de l'opacification du cristallin et de la cataracte nucléaire (cf. Figure 20) (David & Shearer, 1984 ; Shearer et al. 1997).

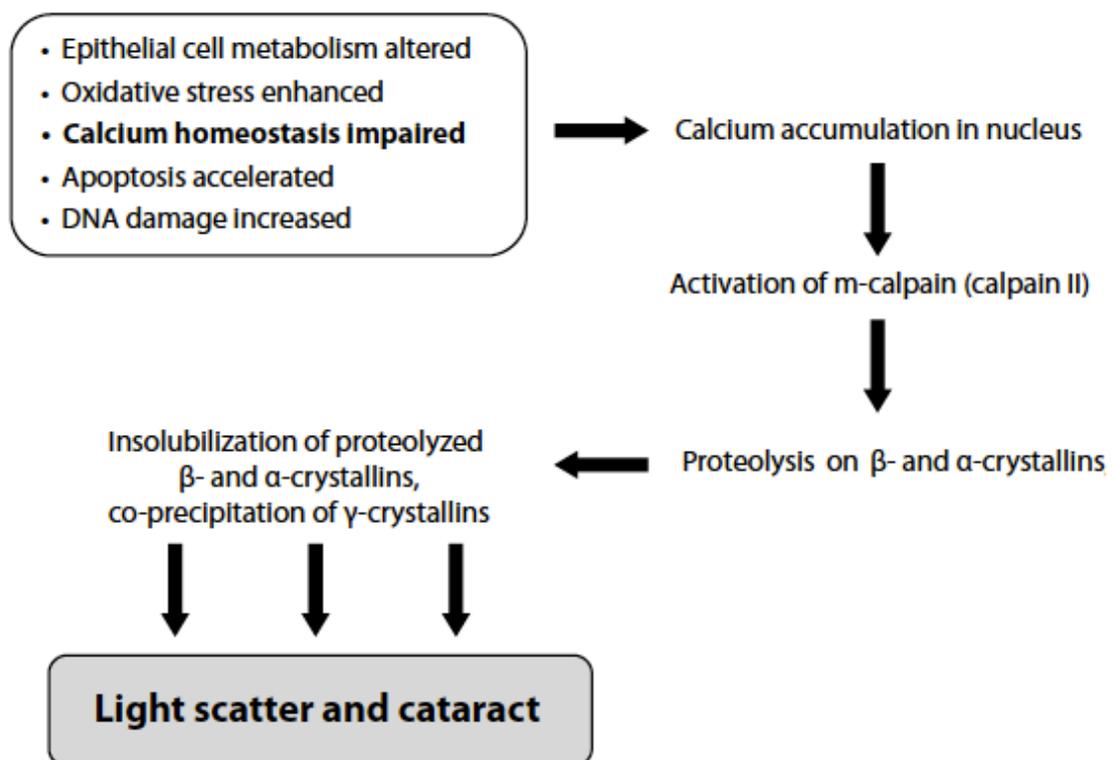


Figure 20. – Mécanisme de formation de la cataracte induite au sélénite de sodium chez le rat (Shearer et al., 1997).

- Intérêt et limites du modèle

Le modèle de cataracte induite au sélénite de sodium est très rapide et facile à mettre en place chez le rat, avec une bonne reproductibilité et une bonne fiabilité. Depuis son introduction en 1977, il est toujours largement utilisé, notamment pour la mise à l'épreuve de nouvelles molécules à visée anticataractogène. En effet, en comparaison d'autres protocoles (radiations, galactose...), ce modèle possède le plus de similitudes avec la cataracte sénile nucléaire de l'homme : augmentation du calcium dans le cristallin, protéolyse et insolubilisation des protéines, diminution des quantités de GSH.

Cependant, il existe aussi un certain nombre de différences non négligeables comme l'absence de formation de ponts disulfure dans les agrégats protéiques, contrairement à ce qui est observé chez l'homme. De plus le modèle est dominé par une protéolyse rapide, dépendante de la calpaïne II, alors que chez l'homme, il s'agit d'un processus plus long, consécutif au stress oxydatif mis en place pendant plusieurs années. En ce qui concerne la calpaïne II, il est d'ailleurs à noter que cette enzyme n'a pas été identifiée au sein du cristallin humain, ce qui constitue une autre différence majeure. Toutefois, dans le cadre de la cataracte sénile, l'étude des cristallines humaines montre des zones de clivage semblables à celles réalisées par la calpaïne II, suggérant l'existence d'un autre type de protéase à action similaire chez l'homme. La connaissance de ces limites apparaît indispensable, et elles sont à prendre en compte au moment de l'établissement des conclusions dans les études précliniques.

Enfin, en 1992, l'équipe de Huang s'est intéressée à la mise au point d'une version « chronique » de ce modèle. Au lieu d'administrer précocement une dose moyenne de sélénite de sodium, ce modèle propose l'administration répétée de doses faibles, sur des animaux légèrement plus âgés (13 jours). Ce modèle permet alors de séquencer plus précisément les événements qui précèdent l'opacification du cristallin, et permet ainsi de tester des molécules avec une action anticataractogène très précoce.

## 3.2 Modèles réalisés chez le rat

Cette partie s'attache à présenter les modèles expérimentaux existants chez le rat, mettant en jeu le sélénite de sodium dans l'induction de cataracte, et leur utilisation dans la recherche ophtalmologique. Chez le rat, les modèles de choix concernent les injections sous-cutanées dès le plus jeune âge ou la culture *in vitro* des cristallins.

### 3.2.1 Exemples d'injection sous-cutanée

**3.2.1.1 OSTADALOVA I, BABICKY A and OBENBERGER J (1977). Cataract induced by administration of a single dose of sodium selenite to suckling rats. Experientia. 34 : 222-223.**

À la fin des années 1970, les laboratoires de l'Académie des Sciences de Prague mettent en évidence un nouvel effet du sélénium suite à son administration à de jeunes rats. En 1977, les scientifiques Ostadalova, Babicky et Obenberger mènent une étude afin d'explorer cette découverte, et décrivent pour la première fois le pouvoir cataractogène du sélénite de sodium.

- Animaux utilisés

Cette étude a été menée sur des rats de race Wistar, et de souche Konarovice. Au total, 206 rats ont été inclus, avec 191 ratons âgés de 10 jours au début de l'étude, et 15 rats âgés de 2 mois.

- Produits utilisés, posologie

La cataracte est obtenue par administration de sélénite de sodium ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), tandis que le groupe contrôle est traité avec un composé soufré équivalent, le sulfite de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ). L'origine des produits n'est pas précisée.

Au total, huit groupes expérimentaux ont été définis pour cette étude et sont récapitulés dans le tableau ci-après (cf. Tableau 1) :

Groupe d'étude	Age des animaux	Produit administré	Dose		Nombre de rats
			µmol/kg	mg/kg	
Groupe 1	10 jours	Sélénite de sodium (Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> )	60	10,4	24
			40	6,9	36
			20	3,5	31
			10	1,7	28
			5	0,9	40
Groupe 2		/	/	16	
Groupe 3		Sulfite de sodium (Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> )	60	10,4	16
Groupe 4	2 mois	Sélénite de sodium (Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> )	20	3,5	15

**Tableau 1. – Répartition des animaux dans les groupes d'étude (Ostadalova et al., 1977).**

○ Voie d'administration

Tous les produits de l'étude ont été administrés par injection sous cutanée.

○ Critères de diagnostic

Pour cette étude, les critères de diagnostic se sont portés sur l'évaluation à distance de la présence d'opacités sur les yeux des rats, après leur ouverture, et sur le caractère intermittent ou permanent de la cataracte observée. Un examen ophtalmologique plus approfondi n'a pas été réalisé.

○ Résultats et discussion

Avec cette étude, l'équipe d'Ostadalova a mis en évidence un certain nombre de particularités concernant ce modèle. Elle montre d'abord que l'induction de la cataracte avec le sélénite de sodium est un modèle rapide, puisqu'avec des rats âgés de 10 jours, une cataracte est obtenue en 10 jours. Celle-ci est même observable dès l'ouverture des yeux des jeunes animaux, au bout de 4 à 6 jours après l'injection.

L'analyse des résultats souligne une influence de la dose sur l'apparition et la qualité de la cataracte obtenue (permanente, intermittente), et sur la mortalité observée. En effet, les doses les plus faibles (5 et 10 µmol/kg) semblent plutôt causer une cataracte intermittente

voire une absence de cataracte, et ne sont pas associées à de la mortalité. Des doses plus fortes (40 et 60  $\mu\text{mol/kg}$ ) provoquent une mortalité plus importante (respectivement 20% et 100% de l'effectif des groupes concernés) sans pour autant induire une cataracte plus stable (16% des cataractes observées sont intermittentes, soit 6 animaux sur 36). Enfin pour une dose moyenne (20  $\mu\text{mol/kg}$ ), même si certains rats ne semblent pas répondre au sélénite de sodium (16% soit 5 rats sur 31), 65% des animaux induits dans ce groupe présentent une cataracte permanente (soit 20 rats sur 31). Cela souligne la nécessité de travailler avec des doses moyennes, afin de maximiser la qualité de ce modèle d'induction de cataracte.

Ainsi, lorsqu'on s'intéresse à la réponse obtenue pour une dose moyenne (20  $\mu\text{mol/kg}$ ), on constate que 65% des cataractes observées sont permanentes, donc stables, et qu'à l'exception de la cataracte, aucune autre affection n'est observable. Par ailleurs, la mortalité pour ce groupe est nettement plus faible (3% de l'effectif, soit 1 rats sur 31). Aux caractéristiques déjà évoquées plus haut, ces résultats ajoutent des notions de reproductibilité, de spécificité et de sécurité du modèle, pour une induction à des rats âgés de 10 jours, en utilisant une dose moyenne de sélénite de sodium.

Enfin, il apparaît que les adultes sont affectés différemment par le sélénite de sodium. À dose équivalente (20 $\mu\text{mol/kg}$ ), la mortalité est nettement plus fréquente chez les adultes (73%, soit 11 individus sur 15), et ceux qui ont survécu n'expriment pas de cataracte. Cette observation confirme les conclusions de précédentes études montrant que la susceptibilité du cristallin pour les modèles expérimentaux de cataracte diminue fortement avec l'âge.

Les résultats présentés dans cette étude sont toutefois à tempérer du fait de l'absence d'uniformité entre les effectifs des différents groupes. L'étude permet de dégager des tendances, et de mettre en reliefs certaines caractéristiques qui demandent ensuite à être éprouvées par d'autres études.

Le tableau suivant (cf. Figure 21) récapitule les résultats obtenus pour cette étude.

The lethal and cataractogenic effect of sodium selenite on adult and suckling male rats (20 days after treatment)

Age	Group of rats	Dose ( $\mu$ moles/kg b.wt)	No. of rats	Mortality		Cataract		Without evident damage
				24 h	7th day	Permanent	Intermittent	
Sucklings (10-day-old)	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	60	24	24	0	0	0	0
		40	36	0	8	22	6	0
		20	31	0	1	20	5	5
		10	28	0	0	5	6	17
		5	40	0	0	0	0	40
	Without treatment	0	16	0	0	0	0	16
Adults (2-month-old)	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	60	16	0	0	0	0	16
	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	20	15	11	0	0	0	4

Figure 21. – Résultats obtenus chez le rat (jeune et adulte), 20 jours après le traitement au sélénite de sodium (Ostadalova et al., 1977).

**3.2.1.2 DOGANAY Selim, BORAZAN M, IRAZ M and CIGREMIS Y (2006). The effect of resveratrol in experimental cataract model formed by sodium selenite. Current Eye Research. 31 : 147-153**

Après la mise en évidence du pouvoir cataractogène du sélénite de sodium en 1977, de nombreuses études se sont attachées à comprendre le mécanisme d'action de cette molécule. Malgré un certain nombre de différences non négligeables, ce modèle regroupe toutefois le plus de similitudes avec la cataracte nucléaire sénile de l'homme. Dès lors, il a été largement employé pour la mise à l'épreuve de molécules susceptibles d'avoir une utilité dans la prévention de cette cataracte.

Cette étude, issue des travaux de Doganay en 2006, est un exemple parmi les nombreux qui existent dans la littérature.

○ Animaux utilisés

Cette étude a été menée sur des rats de race Sprague-Dawley. Au total, 48 ratons âgés de 10 jours ont été inclus au début de l'étude.

- Produits utilisés, posologie

La molécule à visée anticataractogène étudiée est le resvératrol. La cataracte a été obtenue par administration de sélénite de sodium. Le groupe contrôle est traité avec un soluté physiologique contenant 5% d'éthanol, le volume administré n'étant pas précisé. Tous les produits de cette étude ont été fournis par Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

Trois groupes expérimentaux ont été définis pour cette étude (cf. Tableau 2) :

Groupe d'étude	Produit administré	Dose (mg/kg)	Voie d'administration	Nombre de rats
Groupe 1	Soluté physiologique + 5% éthanol	/	Intra-péritonéale	16
Groupe 2	Sélénite de sodium	5,2	Sous cutanée	16
Groupe 3	Sélénite de sodium	5,2	Sous cutanée	16
	Resvératrol	40	Intra-péritonéale	

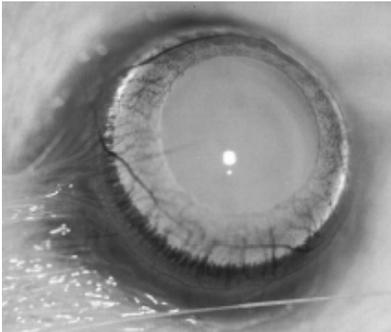
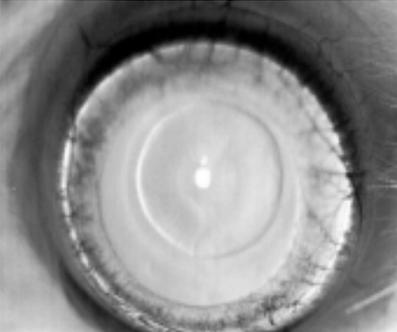
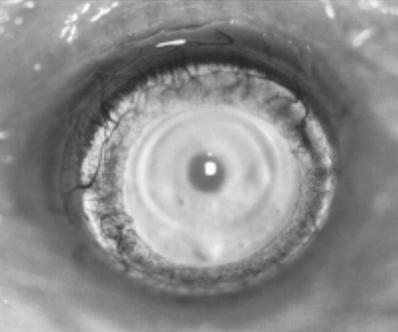
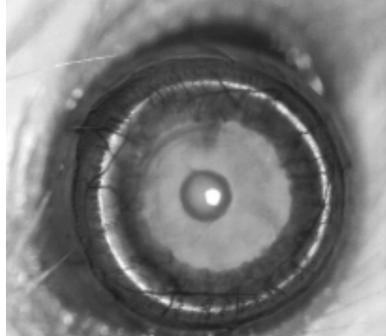
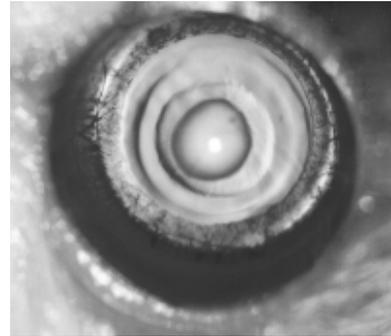
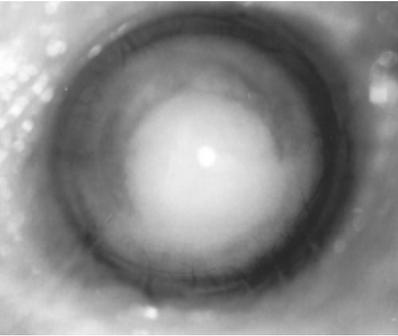
**Tableau 2. – Répartition des animaux dans les groupes d'étude (Doganay et al., 2006)**

- Voie d'administration

Le sélénite de sodium a été administré par voie sous cutanée, tandis que le soluté physiologique et le resvératrol ont été administrés par voie intra-péritonéale. Le choix d'une voie d'administration différente pour le groupe contrôle et pour le resvératrol sera abordé plus tard.

- Critères de diagnostic

Après induction, la mise en place de la cataracte a été évaluée une fois par semaine pendant 3 semaines, par un examen à la lampe à fente. Une seule personne a réalisé ces examens, à l'aveugle (c'est-à-dire ne sachant jamais à quel groupe appartenait l'animal observé). Une échelle a été élaborée pour l'évaluation de la cataracte (cf. Tableau 3, ci-après). Par ailleurs, plusieurs critères ont été retenus pour l'évaluation de l'activité anticataractogène du resvératrol, mais ne seront pas abordés ici.

 <p><b>Grade 0</b> : Cristallin normal, transparent</p>	 <p><b>Grade 2</b> : légère opacité nucléaire, avec fibres gonflées</p>	 <p><b>Grade 3</b> : opacité nucléaire diffuse, dispersion dans le cortex</p>
 <p><b>Grade 4</b> : opacité nucléaire nette</p>	 <p><b>Grade 5</b> : opacité nucléaire dense, n'impliquant pas le cortex</p>	 <p><b>Grade 6</b> : cataracte mûre, impliquant la totalité du cristallin</p>

**Tableau 3. – Échelle d'évaluation de la cataracte (Doganay et al., 2006).**

○ Résultats et discussion

Nous nous intéressons particulièrement à l'efficacité et à la qualité du modèle d'induction au sélénite de sodium, mais aussi à son adaptabilité à l'étude de molécules dans la prévention de la cataracte. Seuls les résultats concernant l'obtention de la cataracte sont abordés, l'activité spécifique du resvératrol n'est pas traitée en détail (cf. Figure 22).

Tout d'abord, cette étude souligne à nouveau la rapidité du modèle, dans la mesure où une cataracte mimant en partie la cataracte nucléaire sénile de l'homme est développée en 21 jours. Ensuite, il est à noter que l'étude se place directement dans le cas de l'injection d'une dose moyenne de sélénite de sodium (5,2 mg/kg) à tous les individus. Dans ce cadre, les résultats montrent que tous les animaux ayant reçu uniquement du sélénite de sodium expriment une cataracte nucléaire, de sévérité assez homogène (grades 3 à 6 sur l'échelle retenue, avec une moyenne de 4,38), sans autre affection manifestée, et sans aucune mortalité. Cela traduit la reproductibilité, la spécificité et la sécurité de cette méthode.

**TABLE 1** Cataract Evaluation in Control Group, Selenite-Treated Group, and Selenite Plus Resveratrol-Treated Group

Groups	S-6	S-5	S-4	S-3	S-2	S-1	S-0	Mean stage
Group 1 (n = 16)	—	—	—	—	—	—	16	—
Group 2 (n = 16)	2	5	6	3	—	—	—	4.38 ± 0.24 <sup>a</sup>
Group 3 (n = 16)	—	—	—	3	6	—	7	1.31 ± 0.31

Group 1, control; group 2, selenite-treated group; group 3, selenite plus resveratrol-treated group; S, cataract stage; n = pair of eyes.

<sup>a</sup>Statistically-different when compared with group 3 (p < 0.05).

**Figure 22. – Résultats d'induction de cataracte chez le rat, 21 jours après le traitement au sélénite de sodium, avec traitement ou non au resvératrol (Doganay et al., 2006)**

Enfin, l'étude des résultats montre que dans le contrôle négatif (groupe 1), aucun rat n'a développé de cataracte, tandis que tous les animaux du contrôle positif (groupe 2) et 56% des individus du groupe test, traité avec du resvératrol et du sélénite de sodium (soit 9 rats sur 16) ont développé une cataracte. Pour ces deux derniers groupes, les affections observées étaient plus sévères pour le contrôle positif (grades 3 à 6) que pour le groupe traité avec du resvératrol (grades 2 et 3 seulement). Les différences trouvées étaient d'ailleurs significatives avec  $p < 0.05$ . Ces résultats mettent en lumière une capacité de prévention de la cataracte du resvératrol (moins d'individus touchés, et avec une intensité moindre). Ainsi, avec la rapidité et la spécificité du modèle, et grâce à un design d'étude adapté (contrôle négatif, contrôle positif et groupe test), il est possible d'obtenir de premiers résultats quant à l'activité préventive du resvératrol, ce qui permet d'affirmer que l'induction de cataracte au sélénite de sodium est la méthode de choix dans la mise à l'épreuve de molécules à visée anticataractogène.

Ces données permettent de retrouver les caractéristiques du modèle au sélénite de sodium évoquées lors de publications précédentes, et d'obtenir de premiers résultats, mais ne permettent pas de conclure avec certitude sur les tendances observées, dans la mesure où les molécules n'ont pas été administrées par les mêmes voies. En effet, le contrôle négatif et la molécule à l'étude ont été administrés par voie intra-péritonéale alors que le contrôle positif a été fait par voie sous cutanée.

### 3.2.2 Exemple de culture *in vitro* de cristallins

En dehors de la multiplication des études portant sur des modèles *in vivo*, de nombreux chercheurs se sont également intéressés à l'étude *in vitro* de la cataracte et de sa prévention. Cette publication en est un exemple :

QI Hui-Ping, WEI SQ, ZHANG LQ, GAO XC, YU NN, BI S and CUI H (2013). Preventive effect of danshensu on selenite-induced cataractogenesis in cultured rat lens. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. 41 : 172-179.

- Animaux utilisés

Cette étude a été menée sur des rats mâles de race Wistar, âgés de cinq semaines. Au total, 12 animaux ont été inclus au début de l'étude *in vitro*.

- Produits utilisés, conditions de culture *in vitro*

L'élément étudié ici est le danshensu, un des composants du danshen, un médicament à base de plante très utilisé en Chine et connu entre autres pour ses propriétés antioxydantes. La cataracte est induite *in vitro* par du sélénite de sodium. Le groupe contrôle négatif ne reçoit aucun traitement.

Après l'euthanasie des animaux et le prélèvement minutieux des cristallins, ceux-ci ont été placés individuellement dans une plaque 24-puits, et mis dans un incubateur à 37°C, sous 5% de CO<sub>2</sub>. Chaque puits contient 1 mL de milieu M-199 tamponné avec de l'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) à 4,77mg/mL, et supplémenté du sérum de veau fœtal (10%), de la pénicilline à 100 U/mL et de la streptomycine à 0,1 mg/mL.

Les cristallins déjà opacifiés après 24 heures du fait de lésions de dissection ont été rejetés, les autres ont été séparés en trois groupes expérimentaux comprenant chacun huit cristallins. La culture a été maintenue et observée pendant cinq jours.

Ces informations sont récapitulées dans le tableau ci-après (cf. Tableau 4) :

Groupe d'étude	Traitement	Jour du traitement	Dose		Milieu de culture	Nombre de cristallins
			µmol/L	µg/mL		
Groupe 1	/	/	/	/	M-199 tamponné et supplémenté	8
Groupe 2	Sélénite de sodium	J3	200	34,6	M-199 tamponné et supplémenté	8
Groupe 3	Sélénite de sodium	J3	200	34,6	M-199 tamponné et supplémenté	8
	Danshensu	J2 à J5	500	110,1		

**Tableau 4. – Répartition des cristallins dans les groupes d'étude (Qi et al., 2013)**

○ Critères de diagnostic

Pour cette étude, les critères de diagnostic se sont portés sur l'évaluation quotidienne de la présence d'opacités sur les cristallins, grâce à un microscope inversé (grossissements 40x, 100x et 200x). D'autres critères de diagnostics concernant l'évaluation de la capacité antioxydante du danshensu ont été également définis, mais ne seront pas abordés en détail ici.

○ Résultats et discussion

Nous nous intéressons à la qualité du modèle d'induction au sélénite de sodium dans une utilisation *in vitro*, pour l'étude de molécules dans la prévention de la cataracte. Les résultats concernant l'obtention de la cataracte sont abordés.

Les résultats montrent que la culture de cristallins *in vitro* en présence de sélénite de sodium reste un modèle très rapide et reproductible, puisqu'il permet d'obtenir une opacification de tous les cristallins du contrôle positif (groupe 2) en 5 jours. De plus, dans le contrôle négatif (groupe 1), tous les cristallins restent complètement transparents. Il s'agit ainsi d'une méthode spécifique, mais délicate à mettre en place du fait de la dissection minutieuse nécessaire des cristallins.

Par ailleurs, l'étude du groupe test, traité avec du sélénite de sodium et du danshensu montre que seulement 25% des cristallins ont présenté une vacuolisation corticale après cinq jours, alors que les 75% restant sont restés transparents.

Les résultats présentés plus haut et la réponse observée pour les cristallins des groupes traités montrent que le modèle reste compatible et efficace dans une étude *in vitro*.

### 3.3 Modèles réalisés chez le lapin

#### 3.3.1 Passage du modèle du rat au lapin

Le lapin possède une anatomie oculaire assez similaire à celle de l'homme, ce qui en fait l'un des modèles expérimentaux les plus fréquemment utilisés en recherche ophtalmologique (Gwon, 2008). Toutefois, l'utilisation du sélénite de sodium pour l'induction de cataracte chez cette espèce est très récente.

Chez le lapin, un nombre restreint d'études est disponible dans la littérature, et celles-ci concernent la mise à l'épreuve de molécules à visée anticataractogène. Contrairement au rat qui dispose d'un protocole d'induction bien établi par plusieurs années de recherche, il n'existe pas d'études *in vivo* visant à comprendre le mécanisme d'action du sélénite de sodium chez le lapin. En conséquence, son utilisation pour cette espèce se décline selon des protocoles variés. Ces méthodes sont généralement inspirées des données disponibles chez le rat, mais il n'existe pas d'homogénéité concernant la race, l'âge des animaux inclus, ou la voie d'administration des produits dans les publications disponibles.

Les seules études *in vivo* recensées dans ce manuscrit emploient une méthode d'injection intravitréenne sous anesthésie générale, rendue possible par l'anatomie oculaire du lapin. Deux publications employant une méthode d'injection sous-cutanée existent, mais elles ne seront pas présentées dans la mesure où elles contiennent des informations contradictoires, et où la vérification des références bibliographiques est sujette à questionnement.

### 3.3.2 Modèle d'injection sous cutanée

Il existe deux publications (*Attenuation of experimental cataract by vitamin C*, Peighambarzadeh and Tavana, 2014 ; *The protective role of silymarine on selenite-induced cataract in rabbit model* ; Kabir et al.) présentant un modèle d'induction de cataracte au sélénite de sodium par injection sous-cutanée. Celles-ci n'ont pas été incluses dans cette présentation dans la mesure où elles comportent un certain nombre de biais d'écriture ne rendant pas possible leur étude méthodique et cohérente.

### 3.3.3 Modèle d'injection intravitréenne

Cette partie vise à recenser les études avec administration intravitréenne chez le lapin, et à discuter des résultats obtenus ainsi que des caractéristiques des modèles présentés. Toutes ont été publiées par un groupe commun d'auteurs et suivent le même mode opératoire :

- ABDUL-HUSSEIN BA and ALZUBAIDY AA (2014). Role of topically applied zinc sulfate in prevention of sodium selenite-induced cataract in rabbits. *International Journal of Advanced Research*. 2 : 1014-1022.
- ABDUL-HUSSEIN BA (2015). Effect of heparin sodium in protection of the lens against cataract induced with intravitreal injection of sodium selenite in rabbits. *International Journal of Scientific and Technology Research*. 4 : 367-375.
- ALKADER SHAKOOR DA and ALZUBAIDY AA (2016). The possible effect of bupropion (0,5%) eye drops against selenite induced cataract in rabbits. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 38.

#### 3.3.3.1 Design des études

##### ○ Animaux utilisés

Ces études ont été menées sur des lapins, âgés d'environ 1 an, et pesant entre 1,5 et 2 kg. Au total, 12 à 18 animaux ont été inclus.

○ Produits utilisés, voie d'administration et posologie

Dans les trois études, la cataracte a été obtenue par une injection unique, intravitréenne de sélénite de sodium, sous anesthésie générale, selon un protocole détaillé plus loin. Cette injection a été pratiquée dans l'œil droit de tous les animaux inclus. Les produits anticataractogènes testés par ces études ont été administrés par voie topique, selon les modalités suivantes :

- Sulfate de zinc et héparine sodique : œil droit. Deux gouttes, trois fois par jour, pendant 5 jours avant l'injection de sélénite de sodium, et jusqu'à 21 jours après.
- Bupropion : œil droit. Deux administrations par jour, pendant 21 jours.
- Eau distillée : œil droit seul (Abdul Hussein & Alzubaidy, 2014), ou œil droit et œil gauche (Abdul Hussein, 2015). Deux gouttes, trois fois par jour, pendant 5 jours avant l'injection de sélénite de sodium, et jusqu'à 21 jours après (Abdul Hussein & Alzubaidy, 2014 ; Abdul Hussein, 2015).

Les designs des trois études sont présentés dans les tableaux récapitulatifs suivant :

Groupe d'étude	Produit administré	Concentration (mg/mL)	Quantité administrée	Lieu d'administration	Voie d'administration	Nombre d'animaux
Groupe 1	Sélénite de sodium	0,1	0,1 mL	Œil droit	Intravitréenne	6
	Eau distillée	/	2 gouttes, 3 fois par jour	Œil droit	Topique	
Groupe 2	Sélénite de sodium	0,1	0,1 mL	Œil droit	Intravitréenne	6
	Sulfate de zinc	2,5	2 gouttes, 3 fois par jour	Œil droit	Topique	

**Tableau 5. – Protocole de l'étude présentée par Abdul Hussein & Alzubaidy (2014)**

Groupe d'étude	Produit administré	Concentration	Quantité administrée	Lieu d'administration	Voie d'administration	Nombre d'animaux
Groupe 1	Sélénite de sodium	0,1 mg/mL	0,1 mL	Œil droit	Intravitréenne	6
Groupe 2	Sélénite de sodium	0,1 mg/mL	0,1 mL	Œil droit	Intravitréenne	6
	Eau distillée	/	2 gouttes, 3 fois par jour	Œil droit et œil gauche	Topique	
Groupe 3	Sélénite de sodium	0,1 mg/mL	0,1 mL	Œil droit	Intravitréenne	6
	Héparine sodique	5000 UI/mL	2 gouttes, 3 fois par jour	Œil droit	Topique	
	Eau distillée	/	2 gouttes, 3 fois par jour	Œil gauche	Topique	

**Tableau 6. – Protocole de l'étude présentée par Abdul Hussein (2015)**

Groupe d'étude	Produit administré	Concentration (mg/mL)	Quantité administrée	Lieu d'administration	Voie d'administration	Nombre d'animaux
Groupe 1	Sélénite de sodium	0,1	0,1 mL	Œil droit	Intravitréenne	NP*
Groupe 2	Sélénite de sodium	0,1	0,1 mL	Œil droit	Intravitréenne	NP*
	Eau distillée	/	NP**	NP*	Topique	
Groupe 3	Sélénite de sodium	0,1	0,1 mL	Œil droit	Intravitréenne	NP*
	Bupropion	5,0	NP**	Œil droit	Topique	

NP\* : Non précisé

NP\*\* : les produits topiques sont administrés 2 fois par jour, sans précision du volume des administrations

**Tableau 7. – Protocole de l'étude présentée par Alkader Shakoor & Alzubaidy (2016)**

○ Protocole d'induction

Pour les injections intravitréennes, l'anesthésie a été réalisée à deux niveaux. Une anesthésie générale a été faite par injection intramusculaire de 0,5mL de kétamine (50mg/mL), et celle-ci était complétée par une anesthésie locale obtenue par application de lidocaïne (2%) sur l'œil. L'injection intravitréenne a ensuite été pratiquée avec une aiguille de 30G, pénétrant dans la sclère, 4mm en arrière du limbe. Le volume injecté était de 0,1mL.

○ Critères de diagnostic

Un examen ophtalmologique a été réalisé, dans une pièce sombre 1, 7, 14 et 21 jours après l'injection de sélénite de sodium. L'observation portait sur les opacités qui obscurcissaient le reflet rétinien, et a été réalisée sous plusieurs angles afin de déterminer leur localisation avec précision. Les scores d'opacification ont ensuite été attribués en suivant la classification LOCS III (Chylack et al., 1993). D'autres critères de diagnostic portant sur l'activité anticataractogène du sulfate de zinc, de l'héparine sodique et du bupropion ont également été définis, mais ne sont pas détaillés ici. Seule l'évolution et les scores d'opacification des cataractes seront abordés dans la partie résultats.

### 3.3.3.2 Résultats

Les études de 2014 et 2015 montrent qu'il est possible d'observer un début d'opacification sous capsulaire postérieure une heure après l'injection de sélénite de sodium, et qu'une cataracte mûre devient observable au bout de 48 à 72 heures. Pour ces deux publications, les scores d'opacification du groupe contrôle négatif, recevant l'eau

distillée, étaient identiques, passant de 0,0 avant injection à 2,8 un jour après, pour augmenter à 4,0 au bout de 7 jours et rester à cette valeur jusqu'à 21 jours après l'injection (cf. Figure 23 et Figure 24). Toutefois, chez certains individus, la cataracte a évolué au stade « cataracte hypermûre », mais leur nombre n'a pas été précisé.

MSC M* ±SEM	Pre-Induction (Days)		Post-Induction (Days)			
	0	5	1	7	14	21
	0.0	0.0	2.8	4.0	4.0	4.00
0.00	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00	

MSCM\* = Mean Score of Cataract Maturity; SEM = Standard Error of Mean; HS = high significant difference ( $p < 0.01$ ) compared to corresponding 0 time value

Figure 23. – Résultats du groupe contrôle, pour l'induction de cataracte chez le lapin, après injection intravitréenne de sélénite de sodium (Abdul Hussein & Alzubaidy, 2014)

Reduction +/- SEM	(Pre-induction)(Day)				(Post-induction)(Day)							
	0		5		1		7		14		21	
	Rt	Lt	Rt	Lt	Rt	Lt	Rt	Lt	Rt	Lt	Rt	Lt
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	0.0	4.0	0.0	4.0	0.0	4.00	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Figure (6): Effect of DW on Mean Score of Cataract Maturity in Rabbits pre and post induction of cataract ( $n=6$ ), SEM = Standard Error of Mean, HS = high significant difference ( $p < 0.01$ ) compared to corresponding preinduction mean score of cataract maturity.

Figure 24. – Résultats du groupe contrôle, pour l'induction de cataracte chez le lapin, après injection intravitréenne de sélénite de sodium (Abdul Hussein, 2015)

L'étude de 2016 montre également que pour le groupe contrôle négatif, le score d'opacification est passé de 0,0 avant injection à 4,0 au bout de 7 jours, puis est resté à cette valeur jusqu'à 21 jours (cf. Tableau 8). L'étude ne fait pas mention d'une augmentation de l'opacification une heure après injection, ni même un jour après, comme c'est le cas pour les deux autres publications.

	Mean score of opacity in rabbits' right eyes			
	First day	First week	Second week	Third week
Normal group	0	0	0	0
Cataract group	0	4	4	4
Bupropion drops group	0	0	0	0

Tableau 8. – Résultats du groupe contrôle, pour l'induction de cataracte chez le lapin, après injection intravitréenne de sélénite de sodium (Alkader Shakoor & Alzubaidy, 2016)

Concernant les groupes test des différentes études, recevant les traitements avant et après induction au sélénite de sodium, l'opacification des cristallins induits a été bien moindre. Avec le sulfate de zinc (Abdul Hussein & Alzubaidy, 2014), ce score est passé de 0,0 avant l'injection, pour atteindre 1,33 au bout de 21 jours (cf. Figure 25). Avec l'héparine sodique (Abdul Hussein, 2015), le score est passé de 0,0 avant l'injection à 1,0 au bout de 14 jours, puis est redescendu à 0,17 après 21 jours (cf. Tableau 9). Enfin, avec le bupropion (Alkader Shakoor & Alzubaidy, 2016), le score d'opacification des cristallins est resté égal à zéro tout au long de l'étude (cf. Tableau 8).

	Pre-Induction (Days)		Post-Induction (Days)			
	0	5	1	7	14	21
MSCM*	0.0	0.0	0.5	0.8	1.2	1.33
±SEM	0.00	0.00	0.02	0.01	0.02	0.04

MSCM\* = Mean Score of Cataract Maturity; SEM = Standard Error of Mean; \*\* = 0.25 mg/drop, NS = No Significant difference ( $p > 0.05$ ) compared to corresponding 0 time value, S = Significant difference ( $0.01 \leq p < 0.05$ ) compared to corresponding 0 time value, HS = high significant difference ( $p < 0.01$ ) compared to corresponding 0 time value

Figure 25. – Résultats du groupe test, pour l'induction de cataracte chez le lapin, après injection intravitréenne de sélénite de sodium (Abdul Hussein & Alzubaidy, 2014)

	Pre-induction (days)		Post-induction (days)			
	0	5	1	7	14	21
MSCM*	0,0	0,0	0,38	0,71	1,0	0,17

MSCM\* = Mean Score of Cataract Maturity

Tableau 9. – Résultats du groupe test, pour l'induction de cataracte chez le lapin, après injection intravitréenne de sélénite de sodium (Abdul Hussein, 2015)

### 3.3.3.3 Discussion

Le premier point de discussion abordé ici concerne la précision dans la présentation des animaux inclus. En effet, la race des lapins n'est jamais précisée, et les photographies incluses dans les études de 2014 et 2015 montrent des animaux très différents (cf. Figure 26). Par ailleurs, dans la publication de 2016 (Alkader Shakoor & Alzubaidy), le nombre d'animaux inclus est également manquant.



**Figure 26. – Photographie des animaux inclus dans les études : à gauche Abdul Hussein & Alzubaidy, 2014, à droite Abdul Hussein, 2015.**

La nature des résultats obtenus d'une publication à l'autre peut également être sujette à discussion. Entre les publications de 2014 et 2015, utilisant des souches d'animaux visiblement différentes (cf. Figure 26), on obtient des résultats strictement identiques pour les groupes contrôle négatif (score d'opacification de  $2,8 \pm 0,17$  au lendemain de l'injection de sélénite de sodium, et de  $4,0 \pm 0,00$  au bout de 7 jours).

Par ailleurs, le délai d'observation de ces résultats est également à souligner. Les publications font état d'un début d'opacification une heure après l'injection intravitréenne du sélénite de sodium chez les lapins. Or, on pourrait penser qu'à ce stade, l'inflammation consécutive à l'injection ne laisserait que peu de place pour un examen ophtalmologique.

De plus, la présentation des résultats ne précise pas le nombre d'animaux inclus dans chaque groupe, seuls les scores moyens sont présentés. Les résultats concernant les groupes « normaux », c'est-à-dire induits mais non traités ne sont pas non plus mentionnés.

Enfin, ces résultats semblent présenter des molécules véritablement efficaces dans la prévention de la cataracte induite au sélénite de sodium, voire dans sa réversion (Abdul Hussein, 2015, cf. Tableau 9). Cependant, ces publications n'ont fait l'objet d'aucun autre article de revue scientifique confirmant ces résultats.

\*\*\*

Depuis la découverte du pouvoir cataractogène du sélénite de sodium en 1977, les modèles expérimentaux mettant en jeu cet agent se sont très bien développés chez le rat, avec une bonne compréhension des mécanismes impliqués.

Chez le lapin, malgré une anatomie propice à la recherche ophtalmologique, l'utilisation du sélénite de sodium est encore très récente. Les publications présentées ci-dessus constituent une aide pour l'élaboration d'autres modèles expérimentaux de cataracte induite par ce produit. Toutefois, au vu du manque de précision dont elles peuvent faire preuve, les informations recueillies dans ces publications peuvent représenter un point de départ de réflexion, mais ne peuvent constituer un outil unique de travail.

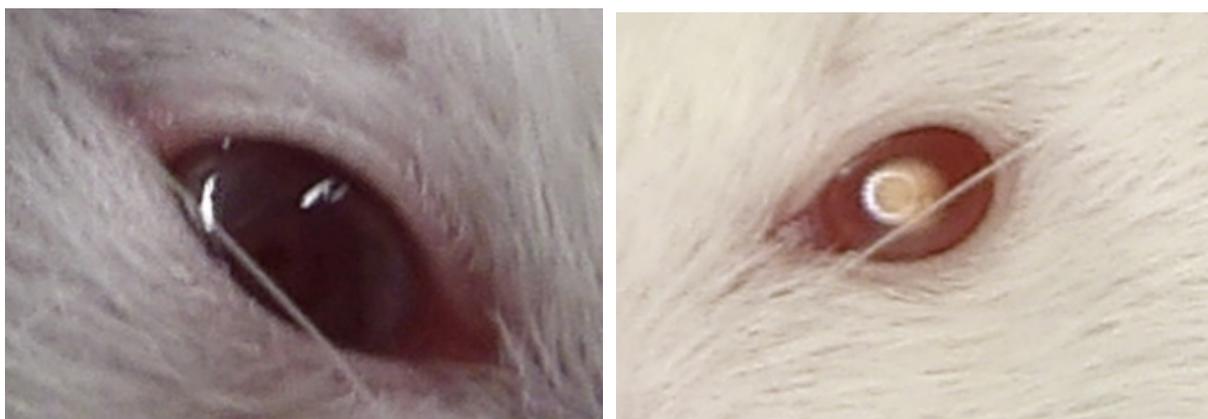
La dernière partie présente ainsi les résultats obtenus à l'aide de la société Imavita, dans le cadre de l'établissement d'un modèle expérimental de cataracte sénile induite au sélénite de sodium chez le lapin sain.

\*\*\*

## 4 ÉTUDE EXPÉRIMENTALE : ÉLABORATION D'UN MODÈLE EXPÉRIMENTAL DE CATARACTE SÉNILE INDUITE AU SÉLÉNITE DE SODIUM CHEZ LE LAPIN SAIN.

Imavita est une société de service d'innovation, implantée dans la pépinière d'entreprises de Théogone, à Ramonville-Saint-Agne (31). L'entreprise compte un directeur scientifique, Éric Lacoste, docteur vétérinaire spécialisé en PK/PD, un directeur financier, Bernard Jacquin, et un chef de projet, Virginie Albinet, PhD en oncologie. Au sein de cette entreprise, l'étude expérimentale présentée ici a été coordonnée par le Docteur Éric Lacoste. La suite de cette partie présente les quatre phases successives mises en place dans la réalisation de cette étude expérimentale.

Parallèlement, et au vu des résultats très peu concluants obtenus à l'issue de la phase 1, un essai a été conduit chez des rats Wistar fournis par Charles River Laboratories (France). Il s'agissait de reproduire le protocole établi par Ostadalova en 1977, et de s'assurer de la qualité du sélénite de sodium utilisé. Ainsi, l'injection sous-cutanée de 5mg/kg de sélénite de sodium à 10 rats de 10 jours a conduit à l'obtention de 100% de cataracte, dont 80% de cataractes nucléaires permanentes (soit 8 rats sur 10) et 20% de cataractes nucléaires intermittentes (soit 2 rat sur 10), sans aucune mortalité (cf. Figure 27).



**Figure 27. – Résultats de l'étude menée chez le rat. À gauche : témoin négatif ; À droite : cataracte sénile nucléaire obtenue après administration sous-cutanée de sélénite de sodium.**

## **4.1 Objectifs et problématique**

L'objectif de cette étude était de développer un protocole expérimental pour l'établissement d'une cataracte nucléaire permanente chez le lapin, avec un minimum de mortalité. Un tel modèle est bien établi chez le rat et a été reproduit dans quelques publications chez le lapin, mais sans précisions concernant par exemple la race et l'âge des animaux. Il s'est avéré nécessaire de combiner toutes ces données, afin d'aboutir au modèle recherché.

Cette partie présente les quatre phases suivies au cours de l'étude. Lors des deux premières phases, des protocoles d'administrations sous cutanées répétées et d'administration sous cutanée unique ont été successivement testés. Pendant les deux dernières phases, nous sommes plutôt intéressés à une méthode d'administration intravitréenne du sélénite de sodium, l'anatomie de l'œil du lapin rendant possible cette autre approche.

## **4.2 Matériel et méthode**

### **4.2.1 Animaux de l'étude**

L'ensemble des expériences utilisant des animaux a été réalisé en accord avec la directive européenne 2010/063/UE et le décret n°2013-118 du 1<sup>er</sup> février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Les protocoles mis en place ont été évalués par un comité d'éthique et autorisés par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Ainsi, les phases de manipulations ont été conduites chez 27 lapins New Zealand White (NZW), âgés de 7 jours à 12 semaines et pesant entre 140g et 3kg suivant les phases expérimentales. Ces animaux ont été fournis par Charles River Laboratories (France) ou Isoquimen (Espagne) selon les phases expérimentales. L'hébergement et l'entretien des animaux ont été assurés par la Zone d'Évaluation Fonctionnelle (ZEF) – Canal Biotech, du Parc Technologique du Canal, situé à Ramonville-Sainte-Agne (31), et par la Faculté de Pharmacie de Toulouse (31), sous la responsabilité de la société Imavita. Le statut sanitaire EOPS (Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique) ou SPF (Specific Pathogen Free) des animaux a été conservé tout au long des manipulations.

Afin d'assurer le bien-être des animaux et minimiser leur potentiel de souffrance et/ou de détresse, des points limites ont été fixés avant de réaliser l'étude. Ainsi, dès que l'un de ces points limites était atteint, l'animal concerné était retiré de l'étude et euthanasié par injection intraveineuse d'une surdose de pentobarbital sodique. Par ailleurs, à la fin de l'étude, tous les animaux ont été euthanasiés en suivant la procédure décrite ci-dessus.

#### **4.2.2 Produit utilisé**

Le sélénite de sodium est un sel existant sous forme d'un solide hygroscopique, incolore, anhydre de formule  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  et de masse molaire égale à 172,94 g/mol, ou pentahydraté de formule  $\text{Na}_2\text{Se}_3(\text{H}_2\text{O})_5$ . Il s'agit du dérivé du sélénium soluble dans l'eau le plus courant (Shearer et al., 1997). Il est en revanche insoluble dans l'éthanol. Le sélénium est toxique par inhalation et en cas d'ingestion, et présente un risque d'effets graves pour les organes suite à des expositions répétées ou prolongées.

Les composés de sélénium sont métabolisés par le foie selon deux voies majeures (réduction en sélénium élémentaire ou réduction en séléniure d'hydrogène puis méthylation), et excrétés principalement dans l'urine et les fèces. L'excrétion est triphasique avec :

- Une première phase caractérisée par une excrétion rapide. Le taux d'excrétion est fonction inverse de la dose administrée et de la concentration de sélénium alimentaire. Ainsi, la demi-vie d'élimination varie de 19,5 jours pour 0,1ppm à 1,2 jours pour 1ppm.
- Une deuxième phase considérée comme une période de transition pendant laquelle le taux d'excrétion est intermédiaire entre les phases 1 et 3
- Une troisième phase, période longue d'excrétion faible et constante. Cette phase correspond au renouvellement corporel à long terme (turn-over physiologique). La demi-vie d'élimination est de 103 jours, et le taux d'excrétion n'est plus influencé par la dose, mais augmente avec la concentration de sélénium alimentaire.

Le sélénite de sodium nécessite donc de prendre des précautions quant à sa manipulation et à l'élimination de ses déchets (Kyselova, 2010 ; INRS, 2011).

### 4.2.3 Préparation des solutions expérimentales

Le sélénite de sodium utilisé dans toutes les phases expérimentales a été fourni par Sigma Aldrich : SIGMA 214485-5G ; lot MKBV 2098V (cf. Figure 28).

**SIGMA-ALDRICH**

[sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com)

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

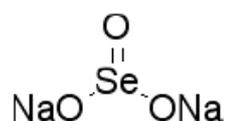
Email USA: [techserv@sial.com](mailto:techserv@sial.com)

Outside USA: [eurtechserv@sial.com](mailto:eurtechserv@sial.com)

## Product Specification

Product Name:  
Sodium selenite - 99%

Product Number: 214485  
CAS Number: 10102-18-8  
MDL: MFCD00003489  
Formula: Na<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Se  
Formula Weight: 172.94 g/mol



TEST	Specification
Appearance (Color)	White to Off-White
Appearance (Form)	Conforms to Requirements
Powder or Crystalline Powder	
X-Ray Diffraction	Conforms to Structure
Gravimetric Analysis	44.9 - 46.3 %
% Selenium (After Reduction With Sulfite)	
Recommended Retest Period	-----
18 Months	

Specification: PRD.0.ZQ5.10000033805

**Figure 28. – Caractéristiques chimiques du sélénite de sodium utilisé pour les phases expérimentales.**

Des solutions fraîches de sélénite de sodium ont été préparées par le Dr. Éric Lacoste avant chaque jour de manipulation. Le Tableau 10 (ci-après) présente les modalités de préparation des solutions expérimentales.

	Date de préparation	Quantité de sélénite de sodium (mg)	Volume de soluté physiologique ajouté (mL)	Dilution	Filtration	Concentration finale de la solution (mg/mL)
<b>Phase 1</b>	29/02/2016 *	52,4	10,0*	1/5	Oui	1
	03/03/2016	23,3	23,0	Non	Oui	1
	07/03/2016	22,2	22,0	Non	Non	1
	16/03/2016	ND	ND	Non	Non	3
	25/03/2016	13,8	6,9	Non	Non	2
	27/03/2016	19,0	9,6	Non	Non	2
	30/03/2016	12,0	12,0	Non	Non	1
<b>Phase 2</b>	20/06/2016	41,0	40,0	Non	Non	1
		121,6	40,0	Non	Non	3
<b>Phase 3</b>	25/07/2016	23,6	23,0	1/10**	Oui**	0,1
	11/08/2016	ND	ND	Non	Oui**	0,1
		ND	ND	Non	Oui**	1
<b>Phase 4</b>	12/09/2016	ND	ND	Non	Oui**	1

*ND : information non détaillée*

*\*\* La dilution et la filtration ont été réalisées avec des instruments stériles, sous hotte stérile.*

**Tableau 10. – Préparation des solutions de sélénite de sodium au cours des phases expérimentales.**

La solution du 29/02/2016 (\*) a été préparée avec de l'eau pure stérile, et a été mal tolérée au moment de son utilisation (gêne à l'injection, lésions de grattage). À partir du 03/03/2016 et pour le restant de la phase expérimentale, toutes les solutions ont été préparées avec du soluté physiologique.

#### **4.2.4 Critères retenus pour l'examen ophtalmologique**

##### **4.2.4.1 Matériel utilisé**

Le matériel utilisé pour les examens comporte : une source lumineuse ponctuelle, un ophtalmoscope équipé d'une fente lumineuse et une lampe à fente binoculaire.

##### **4.2.4.2 Examen à distance**

Tous les examens ophtalmologiques réalisés dans cette étude ont commencé par un examen des globes oculaires et de la fonction visuelle, dans une pièce éclairée et avec l'animal tenu par une aide.

Dans un premier temps, la présence ou non d'opacités, de lésions ou d'anomalies est rapidement appréciée par une observation à distance des globes oculaires en se plaçant d'abord face à l'animal pour une évaluation simultanée, puis pour chaque œil séparément. Ensuite, le cas échéant, l'examen de la fonction visuelle consiste en un test des réflexes de clignement à la menace et de clignement à la lumière.

#### 4.2.4.3 Examen rapproché

- Méthode

Les examens ophtalmologiques comprennent ensuite un examen rapproché successif des deux yeux, mené dans une pièce faiblement éclairée, à l'aide d'un ophtalmoscope et/ou d'une lampe à fente et l'animal étant toujours tenu par une aide.

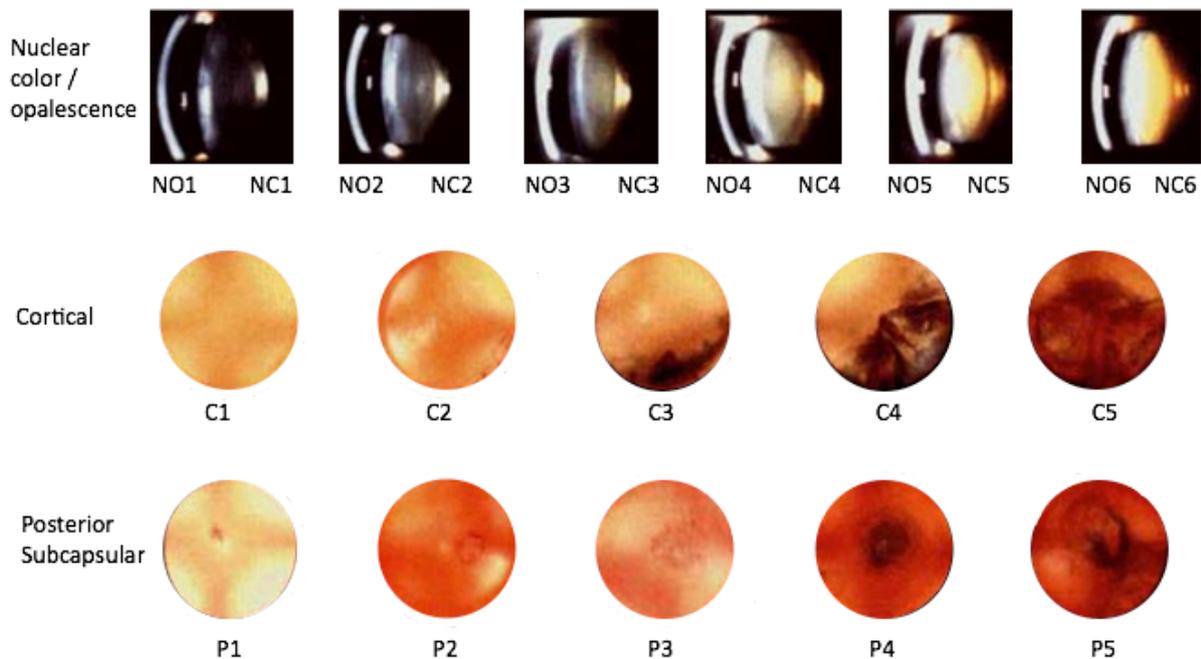
D'une part, la recherche de modifications concernant la transparence et la profondeur de la chambre antérieure passe par l'inspection de la chambre antérieure. D'autre part, l'évaluation de la modification de la transparence ou du positionnement du cristallin est permise par un examen plus en détail de cette structure. Ce dernier ne peut être réalisé qu'après la mise en place d'une mydriase pharmacologique. Dans cette étude, l'utilisation d'un collyre de tropicamide (**Mydriaticum® 0,5% collyre**) a été préférée à celle d'un collyre d'atropine. En effet, certains lagomorphes possèdent une atropinase dans l'iris, rendant l'atropine inefficace (Williams, 2007). La lampe à fente permet alors de visualiser le cristallin en profondeur et sur toute sa largeur, si celui-ci est bien transparent. L'évaluation de la modification de la transparence du cristallin a été réalisée en s'appuyant sur la LOCS III (Lens Opacities Classification System III), décrite ci-dessous. L'examen du fond d'œil n'a, en revanche, pas été réalisé.

- Définition de la LOCS III

Avec une part grandissante de la population mondiale touchée par cette affection, l'évaluation du degré de sévérité de la cataracte a suscité beaucoup d'intérêt dans la recherche clinique et épidémiologique. De nouveaux systèmes plus ou moins sophistiqués ont ainsi été développés dans le but de disposer d'outils uniformes, reproductibles et précis pour l'évaluation de la cataracte.

Les premiers systèmes établis reposent sur l'attribution de grades décimaux suite à la comparaison entre l'aspect clinique retrouvé en examen à la lampe à fente et l'aspect d'images standardisées et éditées pour ces classifications. On compte parmi eux l'Oxford Cataract Classification and Grading System (OCGS) (Sparrow et al., 1986), la Lens Opacities Classification System I à III (LOCS) (Chylack et al., 1993) ou encore le Wilmer Nuclear Grading System (Duncan et al. 1997). La plus utilisée est la LOCS III (cf. Figure 29), en particulier dans

le cadre de la recherche ophtalmologique concernée par la cataracte. En effet, cette classification est souvent employée pour évaluer le degré d'opacification des cristallins chez les animaux inclus dans les études.



**Figure 29. – Système de classification III des opacités du cristallin (Chylack et al., 1993)**

En 2002, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) publie un système simplifié de codage de la cataracte visant à faciliter les enquêtes épidémiologiques sur le terrain chez l'homme (Thylefors, 2002). Cette classification repose sur l'examen à la lampe à fente, et regroupe les forces et avantages des différents systèmes existants en un seul, permettant d'obtenir des données comparables d'un pays à l'autre pour les formes les plus fréquentes de cataractes.

Malgré la mise au point de nouvelles technologies, notamment en matière d'imagerie avec la densitométrie par caméra de Scheimpflug, les systèmes de codages tels que la LOCS III sont toujours des outils utilisés. En effet, l'équipe de Grewal a montré la bonne corrélation entre les résultats obtenus par densitométrie et ceux obtenus avec la LOCS III, justifiant son utilisation en tant que système d'évaluation efficace et économique (Grewal, 2009).

#### **4.2.4.4 Examen microscopique de cristallins ex vivo**

Dans certains cas, des cristallins ont été prélevés après euthanasie de l'animal et mis en culture pour une observation *ex vivo*. Il s'agit de situations pour lesquelles une opacité a été mise en évidence sur le cristallin lors de l'examen rapproché, mais où il s'est avéré difficile de décrire ou localiser cette opacité avec précision. Les cristallins ont alors été placés sur du papier millimétré ou sur un fond noir et un système de graduation de l'opacité a été utilisé pour évaluer leur transparence :

- Grade 0 : cristallin complètement transparent, quadrillage totalement visible
- Grade 1 : léger voile sur le cristallin, quadrillage visible
- Grade 2 : voile plus important, quadrillage qui reste en partie visible
- Grade 3 : cristallin complètement opaque, quadrillage non visible.

### **4.3 Résultats des phases expérimentales**

#### **4.3.1 Administrations sous-cutanées**

##### **4.3.1.1 Phase 1**

Le protocole retenu dans la phase 1 a été élaboré à partir de l'étude de Kabir et al. de 2014. Ainsi dans cette phase, nous avons suivi un protocole d'administrations sous-cutanées répétées, avec trois injections à trois jours d'intervalle (J0, J3 et J6).

##### ○ Étape 1

Quatre lapins mâles New Zealand White âgés de 7 à 8 semaines ont reçus trois injections sous-cutanées d'une solution de sélénite de sodium d'une concentration de 1mg/mL, pour une dose totale de 1mg/kg, à trois jours d'intervalle. Ces animaux ont reçu les identifications lapin n°1 à lapin n°4. Le protocole précis de l'étude est disponible en Annexe 1.

L'observation des animaux 2, 3 et 8 jours après la dernière administration n'a montré aucun développement de cataracte. Par ailleurs, il n'y a eu aucune mortalité, et les injections ont été bien tolérées, avec seulement de légères lésions de grattage aux points d'injection.

- Étape 2

Pour cette étape, réalisée 9 jours après la dernière administration de l'étape 1, les lapins n°2 et n°4 ont été utilisés. Ils ont chacun reçu une injection sous-cutanée unique d'une solution de sélénite de sodium de concentration 3mg/mL, pour une dose de 3mg/kg.

Au bout de 24 heures, le lapin n°2 a été retrouvé mort. Une autopsie a été réalisée, montrant des lésions hépatiques (foie marbré, un lobe nécrosé, non fonctionnel), mais ne mettant pas en évidence de cataracte sur les cristallins. Par ailleurs, aucune cataracte n'a pu être observée sur le lapin n°4.

- Étape 3

Deux lapins mâles New Zealand White âgés de 5 semaines (lapin n°5 et lapin n°6) ont reçus trois injections sous-cutanées d'une solution de sélénite de sodium, à trois jours d'intervalle. Les deux premières injections ont été réalisées avec une dose de sélénite de sodium de 2mg/kg. Au lendemain de la deuxième injection, le lapin n°6 a été retrouvé mort. La dernière injection du protocole pour le lapin n°5 a donc été réalisée avec une dose de 1mg/kg de sélénite de sodium. Le protocole précis de l'étude est disponible en Annexe 2.

L'observation des yeux 2 et 5 jours après la dernière injection n'a pas montré de développement de cataracte pour le lapin n°5. Le suivi des animaux au cours de cette étape a mis en évidence la présence de lésions érythémateuses, avec une peau adhérente au point d'injection.

- Bilan

Le protocole mis en place pendant la phase 1 n'a pas permis d'induire le développement d'une cataracte chez les animaux étudiés. À des doses modérées (1mg/kg), les administrations ont été assez bien tolérées malgré une légère réaction aux points d'injection, tandis que des doses plus élevées (2-3mg/kg) ont entraîné de la mortalité.

#### 4.3.1.2 Phase 2

Le protocole retenu dans la phase 2 a été inspiré de l'étude d'Ostadalova de 1977. Ainsi dans cette phase, nous avons suivi un protocole avec une administration sous-cutanée unique, réalisée sur des lapereaux mâles et femelles de 7 jours. Les administrations ont été exceptionnellement effectuées directement par l'éleveur/fournisseur, c'est-à-dire par la société Isoquimen (Barcelone), sous la responsabilité d'Imavita.

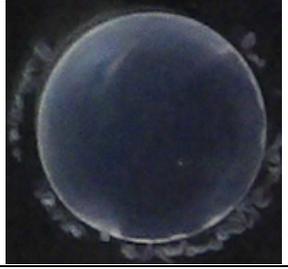
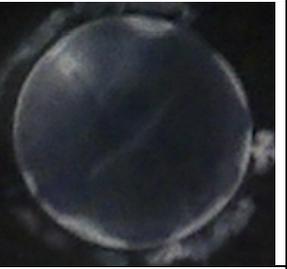
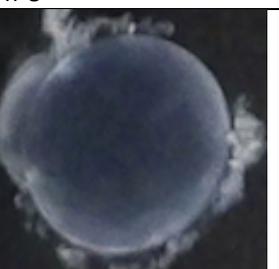
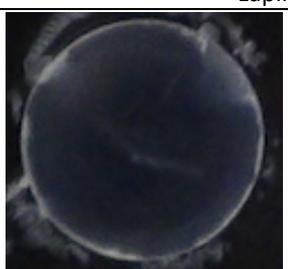
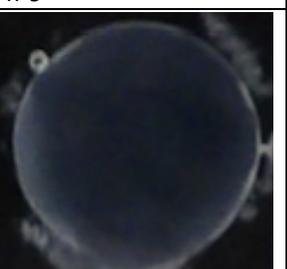
Neuf lapereaux d'une même portée ont reçu les identifications lapin n°1 à n°9, et ont été divisés en trois groupes. Ils ont ensuite été gardés sur le lieu d'élevage jusqu'à l'âge de 21 jours, puis ont été transférés aux locaux d'Imavita à l'âge de 28 jours. Dès leur réception, soit 28 jours après l'administration de sélénite de sodium, les yeux de chaque lapin ont été examinés. Le tableau ci-dessous récapitule ces informations :

	Identification	Produit administré (concentration)	Dose (mg/kg)	Résultats observés
<b>Groupe 1</b> « Excipient »	Lapin n°1	Soluté physiologique stérile	/	Pas de cataracte observée. Pas de lésions au point d'injection.
<b>Groupe 2</b> « Faible dose »	Lapin n°2	Sélénite de sodium (1mg/mL)	1	Pas de cataracte observée. Pas de lésions au point d'injection.
	Lapin n°3			
	Lapin n°4			
	Lapin n°5			
<b>Groupe 3</b> « Forte dose »	Lapin n°6	Sélénite de sodium (3mg/mL)	3	L'examen rapproché des cristallins montre un léger voile chez tous les animaux de ce groupe. Pas de lésions au point d'injection.
	Lapin n°7			
	Lapin n°8			
	Lapin n°9			

Tableau 11. – Répartition des animaux dans les groupes d'étude de la phase 2 et résultats obtenus.

Les cristallins des individus des groupes 1 et 3 ont ensuite été prélevés et observés *ex vivo*.

Le tableau suivant présente les clichés des cristallins effectués après dissection :

<b>Groupe 1</b> « excipient »	Lapin n°1			
				
<b>Grade d'opacification</b>	Lapin n°1 : Grade 1 / Grade 2			
<b>Groupe 3</b> « forte dose »	Lapin n°6		Lapin n°7	
				
	Lapin n°8		Lapin n°9	
				
<b>Grade d'opacification</b>	Lapin n°6 : Grade 2 Lapin n°8 : Grade 2		Lapin n°7 : Grade 1 Lapin n°9 : Grade 1	

**Tableau 12. – Photographies des cristallins des individus des groupes 1 et 3, après dissection.**

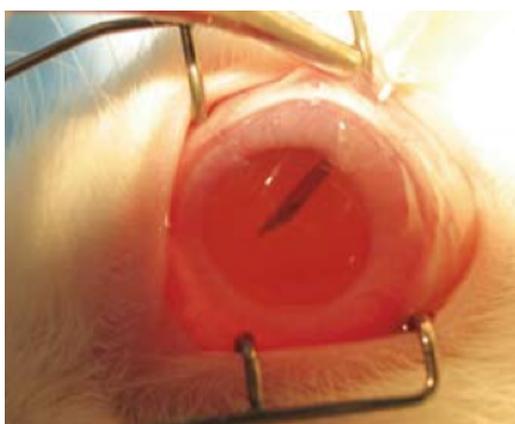
L'observation des clichés ne permet pas de conclure à une véritable opacification des cristallins pour le groupe 3 « forte dose ». En effet, les cristallins du lapin n°1 (« excipient ») présentent également un voile qui ne permet pas de conclure à un effet du sélénite de sodium. Ce voile peut être lié à un délai trop important entre la dissection et la prise du cliché.

- Bilan

Le protocole mis en place pendant la phase 2 a conduit à une opacification de répartition assez homogène entre les régions nucléaire et corticale des cristallins chez les individus ayant reçu 3mg/kg de sélénite de sodium à 7 jours. Par ailleurs, ce protocole ne permet pas d'évaluer la rapidité de développement de cette opacification, mais permet d'affirmer que cette dernière est permanente. Cependant, les résultats obtenus ne sont pas significatifs et ne permettent pas de conclure avec certitude à la présence d'une cataracte pour ce groupe. Par ailleurs, les administrations chez de très jeunes animaux ont été bien tolérées quelle que soit la dose employée (1 ou 3mg/kg), malgré une légère réaction aux points d'injection, et n'ont entraîné aucune mortalité.

### **4.3.2 Administrations intravitréennes**

Le protocole retenu dans les phases 3 et 4 a été élaboré à partir des études de Abdul-Hussein, Alzubaidy et Alkader Shakoor (Abdul-Hussein et Alzubaidy, 2014 ; Abdul-Hussein, 2015 ; Alkader Shakoor et Alzubaidy, 2016). La méthode pour les injections intravitréennes a été conçue à partir des recommandations de Karth et al., 2014 (Karth et al., 2014). Un exemple de la voie d'abord employée pour les injections intravitréennes est illustré en Figure 30.



**Figure 30. – Voie d'abord pour une injection intravitréenne chez le lapin (Ellegaard Göttingen Minipigs – minipigs.dk)**

#### 4.3.2.1 Phase 3

Les lapins n°2, 3, 4 et 5 (Groupe 2 « Faible dose ») de la phase 2 ont été utilisés. La phase 3 a débuté 36 jours après l'injection sous-cutanée unique de la phase 2. Les injections intravitréennes ont été effectuées sous anesthésie générale, avec le protocole suivant :

	Produit utilisé	Dose (mg/kg)
Pré-anesthésie	Robinul® (Glycopyrrolate)	0,1
	Calmivet® (Acépromazine)	1,0
	Buprécare® (Buprénorphine)	0,05
Anesthésie	Rompun® 2% (Xylazine)	4,0
	Imalgene® 1000 (Kétamine)	20

**Tableau 13. – Protocole anesthésique retenu pour les injections intravitréennes.**

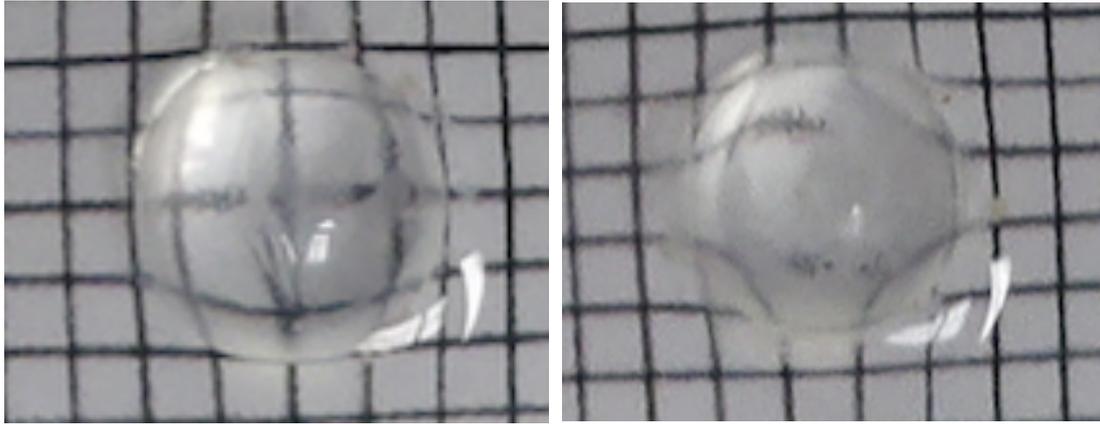
L'anesthésie générale a été complétée par une anesthésie locale, avec un collyre de Tétracaïne (**Tétracaïne 1% - Collyre unidose®**). Le mode opératoire des injections est détaillé en Annexe 3.

- Étape 1

Dans un premier temps, les lapins n°4 et 5 ont eu une injection intravitréenne dans chaque œil. L'œil droit a reçu 0,1mL d'une solution de sélénite de sodium de concentration 0,1mg/mL, pour une dose de 0,01mg, tandis que l'œil gauche a reçu 0,1mL de soluté physiologique stérile.

Les contrôles au moment du réveil et 24h après l'injection ne montrent pas de cataracte lors de l'examen à distance, mais mettent en évidence une inflammation sur les yeux des deux individus, plus marquée chez le lapin n°4 et accompagnée d'une hémorragie bénigne sur la sclère et légèrement diffusée dans chambre vitrée. L'examen rapproché des yeux 10 jours après l'injection ne montre pas l'existence d'une cataracte.

Les cristallins du lapin n°4 ont été prélevés et observés *ex vivo*, tandis que le lapin n°5 a été maintenu dans l'étude. Les clichés obtenus sont présentés dans la Figure 31, ci-après.



**Figure 31. – Cristallins prélevés sur le lapin n°4, 10 jours après injection intravitréenne. À gauche, cristallin gauche ayant reçu 0,1mL de soluté physiologique. À droite, cristallin droit ayant reçu 0,1mL de sélénite de sodium (0,1mg/mL).**

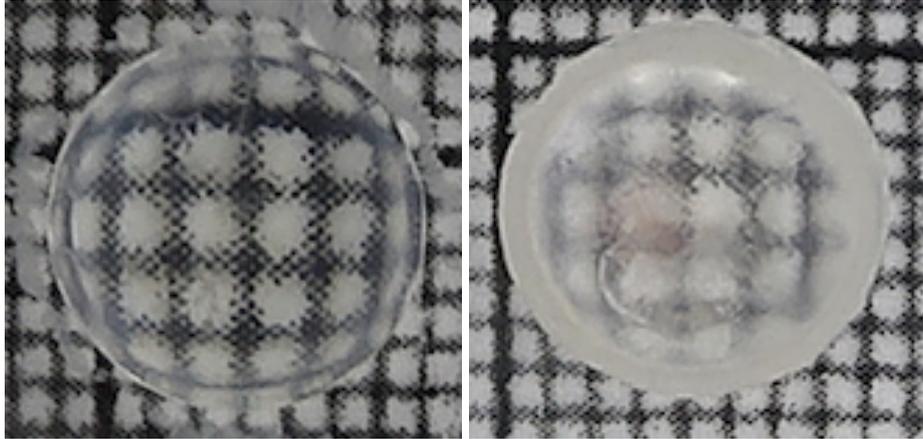
Le cristallin droit semble légèrement plus opaque que celui de gauche, le quadrillage du papier millimétré est moins net. Cependant, ces observations ne peuvent être affirmées avec certitude dans la mesure où les deux cristallins présentent également une opacification en surface qui peut être liée à la manipulation. En effet, si un délai trop important s'écoule entre la dissection et la prise des clichés, il est possible d'observer un dessèchement et une dégradation de la surface des cristallins.

- Étape 2

Dans un second temps, 16 jours après le premier essai intravitréen, les lapins n°2, 3 et 5 ont reçu une injection intravitréenne dans chaque œil. Pour le lapin n°2, l'œil droit a eu 0,1mL d'une solution de sélénite de sodium de concentration 10mg/mL, pour une dose de 1mg, tandis que l'œil gauche a reçu 0,1mL de soluté physiologique stérile. Pour les lapins n°3 et 5, l'œil droit a reçu 0,1mL d'une solution de sélénite de sodium de concentration 1mg/mL, pour une dose de 0,1mg, tandis que 0,1mL de soluté physiologique stérile a été injecté dans l'œil gauche.

Le contrôle des trois animaux 24 heures après l'injection a montré une inflammation intense sur les yeux ayant reçu le sélénite de sodium, et plus modérée sur les yeux ayant reçu le soluté physiologique stérile. En particulier, l'œil droit du lapin n°2 était douloureux au toucher et présentait un myosis permanent, mais sans signes de souffrance générale de

l'animal. L'examen à la lampe à fente, rendu impossible par le myosis, n'a pas permis de déterminer la présence ou non d'une opacification, les cristallins de cet individu ont donc été prélevés et observés *ex vivo*. Les clichés obtenus sont présentés dans la Figure 32 :

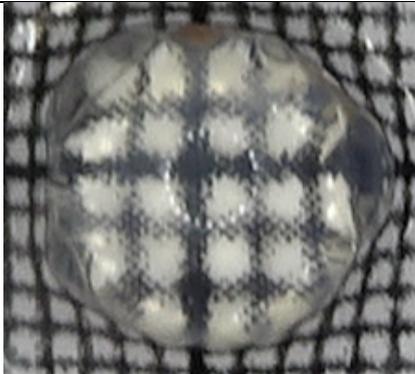
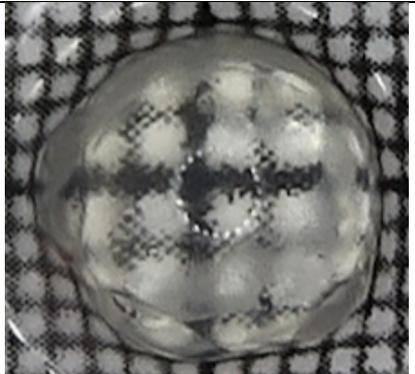
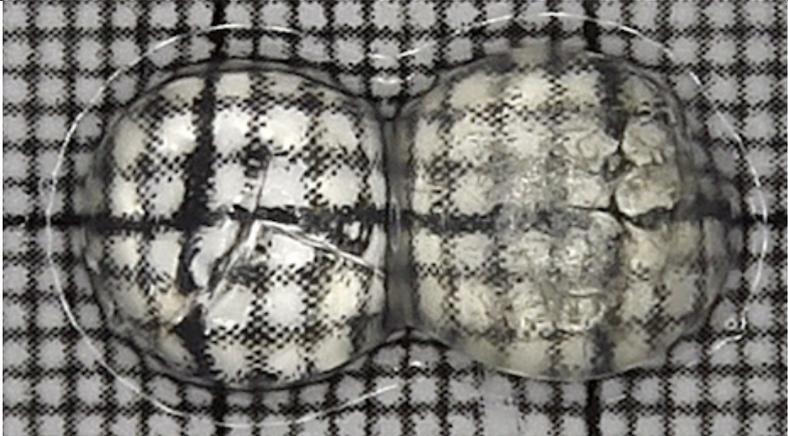


**Figure 32. – Cristallins prélevés sur le lapin n°2, 24 heures après injection intravitréenne. À gauche, cristallin gauche ayant reçu 0,1mL de soluté physiologique. À droite, cristallin droit ayant reçu 0,1mL de sélénite de sodium (10mg/mL).**

Le cristallin droit montrait une opacification de Grade 1 au centre mais de Grade 3 en région corticale. La coloration rouge visible en surface du cristallin semblait provenir d'une légère hémorragie uvéale survenue au moment de l'injection intravitréenne. Le voile présent sur le cristallin gauche semblait avoir pour origine un dessèchement de sa surface.

Chez les lapins n°3 et 5, l'examen rapproché des yeux 5 jours après l'injection montrait une légère opacification de l'œil droit. Les cristallins de ces deux individus ont alors été prélevés et observés *ex vivo*.

Les clichés obtenus sont présentés dans le Tableau 14 :

	Œil Gauche – Soluté physiologique	Œil droit – Sélénite de sodium 1mg/mL
Lapin n°3		
Grade d'opacification	Grade 1	Région centrale : Grade 1/2 Région corticale : Grade 2/3
Lapin n°5		
Grade d'opacification	Grade 0	Grade 0

**Tableau 14. – Cristallins prélevés sur les lapins n°3 et 5, 5 jours après injection intravitréenne. À gauche, cristallins gauche ayant reçu 0,1mL de soluté physiologique. À droite, cristallins droit ayant reçu 0,1mL de sélénite de sodium (1mg/mL).**

Pour le lapin n°3, le cristallin droit montrait une opacification de Grade 1 à 2 au centre mais de Grade 2 à 3 en région corticale. Le voile (Grade 1) présent sur le cristallin gauche pouvait de nouveau provenir d'un dessèchement de la surface du cristallin. Pour le lapin n°5, le cristallin droit ne présentait pas d'opacification, mais plutôt un jaunissement de l'ensemble de la structure. Le cristallin gauche ne présentait pas de voile ou d'opacification.

- Bilan

Le protocole mis en place pour la phase 3 a conduit à une opacification des cristallins. Celle-ci semble plus marquée en région corticale du cristallin, et accompagnée d'une opalescence plus modérée en région nucléaire. Cependant, les résultats ne peuvent être affirmés avec certitude, dans la mesure où les contrôles présentaient également un voile en surface. Cela pourrait provenir d'un dessèchement de surface, lié à un délai trop important écoulé entre la dissection et la prise des clichés.

Ce mode d'induction s'avère assez rapide, puisque les opacifications ont été observées au bout de 5 à 10 jours. Si les résultats de l'étape 1 sont douteux, les opacifications ont bien été observées chez 2 individus sur 3 pour l'étape 2. Par ailleurs, les administrations intravitréennes ont entraîné une inflammation modérée des yeux qui se sont résolues après quelques jours, et n'ont pas causé de mortalité.

#### ***4.3.2.2 Phase 4***

Pour la phase 4, sept lapins mâles New Zealand White âgés de 7 à 8 semaines ont été identifiés lapin n°1 à n°7, et ont été divisés en deux groupes : Groupe 1 « Excipient », et Groupe 2 « Sélénite de sodium ». Pour les individus du groupe 1, les deux yeux ont reçu 0,1mL de soluté physiologique stérile. Pour les individus du groupe 2, les deux yeux ont reçu une injection de 0,1mL d'une solution de sélénite de sodium de concentration 1mg/mL, pour une dose de 0,1mg. Les injections intravitréennes ont été effectuées sous anesthésie générale, en suivant le même protocole que celui de la phase 3 (cf. Tableau 13).

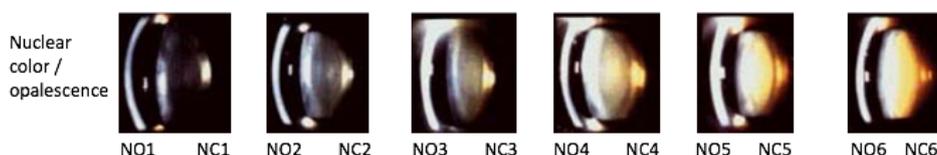
Les contrôles 24 heures et 4 jours après les injections ont impliqués un examen à distance des yeux, et une évaluation des fonctions visuelles (réflexe de clignement à la lumière). Pour les individus du groupe 1, le réflexe de clignement à la lumière était toujours positif, 24h ou 4 jours après les injections. Pour ceux du groupe 2, le réflexe de clignement à la lumière était en revanche négatif pour tous les individus, 24h ou 4 jours après les injections.

Les résultats de ces observations sont présentés dans le Tableau 15, ci-après :

	Identification	Produit administré (Volume)	Dose (mg)	Observations 24h après injection	Observations 4j après injection	Réflexe de clignement à la lumière
<b>Groupe 1 « Excipient »</b>	Lapin n°1	Soluté physiologique (0,1 mL)	/	Légère douleur.	Aspect normal des yeux.	Réflexe positif à 24h et à 4 jours
	Lapin n°2					
<b>Groupe 2 « Sélénite de sodium »</b>	Lapin n°3	Sélénite de sodium 1mg/mL (0,1mL)	0,1	Aspect blanc des 2 yeux, plus intense à gauche. Yeux douloureux.	Aspect blanc persistant de l'œil gauche.	Réflexe négatif à 24h et à 4 jours
	Lapin n°4			Aspect blanc de l'œil gauche. Cornée blanchie sur l'œil droit. Yeux douloureux.	Aspect blanc persistant de l'œil gauche, mais moins intense que le lapin n°3	Réflexe négatif à 24h et à 4 jours
	Lapin n°5			Aspect blanc des 2 yeux. Yeux douloureux.	Aspect normal des yeux.	Réflexe négatif à 24h et à 4 jours
	Lapin n°6			Aspect normal des 2 yeux. Yeux douloureux.	Aspect normal des yeux.	Réflexe négatif à 24h et à 4 jours
	Lapin n°7			Aspect normal de l'œil droit. Œil gauche légèrement blanchi Douleur légère.	Aspect normal des yeux.	Réflexe négatif à 24h et à 4 jours

**Tableau 15. – Répartition des animaux dans les groupes d'étude de la phase 4 et résultats obtenus.**

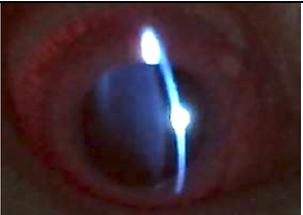
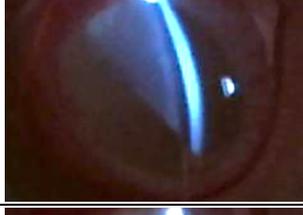
Les examens rapprochés, réalisés 7 jours après l'injection initiale, ont permis de mettre en évidence la présence d'opacités nucléaires. Des clichés ont été pris, et l'utilisation de l'échelle standardisée LOCS III (cf. Figure 33) a ensuite permis de grader cette opacification. Cette échelle permet de comparer les clichés obtenus à des images standardisées, attribuées aux scores 1 à 6. La LOCS III permet ensuite l'utilisation de scores décimaux, si l'élément étudié se situe entre deux standards.



**Figure 33. – Opacités nucléaires du cristallin, extrait du LOCS III (Chylack et al., 1993).**

Ainsi, les lapins du groupe 1 (« excipient ») ont reçu le score minimum « NO1 » pour les deux yeux. Pour les individus du groupe 2, induit avec le sélénite de sodium, les scores s'étalaient de « NO2 » à « NO3 », avec 50% (soit 5 cristallins observés sur 10) de scores « NO2 », 40% (soit 4 cristallins sur 10) de scores « NO2.5 » et 10% (soit 1 cristallin sur 10) de score « NO3 ».

Les résultats des observations sont présentés dans le Tableau 16 ci-après :

	Identification	Images obtenues à la lampe à fente		Grade d'opacité nucléaire (NO)
		Œil gauche	Œil droit	
Groupe 1 « Excipient »	Lapin n°1			OG : NO 1 OD : NO 1
	Lapin n°2			OG : NO 1 OD : NO 1
Groupe 2 « Sélénite de sodium »	Lapin n°3			OG : NO 2 OD : NO 3
	Lapin n°4			OG : NO 2.5 OD : NO 2.5
	Lapin n°5			OG : NO 2.5 OD : NO 2.5
	Lapin n°6			OG : NO 2 OD : NO 2
	Lapin n°7			OG : NO 2 OD : NO 2

OD : Œil droit ; OG : Œil gauche

**Tableau 16. – Résultats des examens rapprochés des individus inclus dans la phase 4, 7 jours après injection intravitréenne de 0,1mL de sélénite de sodium de concentration 1mg/mL.**

- Bilan

Le protocole mis en place pour la phase 4 a conduit à une opacification modérée de tous les cristallins ayant reçu du sélénite de sodium. Les résultats de cette phase ont confirmé la rapidité d'induction, puisque les opacifications sont visibles sur les cristallins 7 jours après l'injection intravitréenne, mais ne permet pas d'affirmer le caractère permanent ou intermittent de ces observations. Les administrations intravitréennes ont entraîné une inflammation et une douleur oculaire qui a disparu en quelques jours. Par ailleurs, elles n'ont pas causé de mortalité.

## 5 DISCUSSION

Les protocoles expérimentaux retenus pour les différentes phases de notre étude ont été élaborés en s'inspirant de protocoles disponibles dans la littérature. Peu de données sont disponibles sur l'utilisation du sélénite de sodium pour l'induction de cataracte chez le lapin, et ces publications nous permettaient d'avoir un axe de départ pour notre travail. Cependant, nous avons également évoqué les biais relatifs à ces études et les questionnements soulevés par leur utilisation. Le choix a été fait d'adapter ces protocoles à nos moyens matériels, et de les mettre à l'épreuve.

La discussion présentée ici portera d'une part sur les choix effectués pour la réalisation de la phase expérimentale dans son ensemble, en regard des résultats qui ont été obtenus, et d'autre part, des propositions d'améliorations seront effectuées, en vue d'éventuels nouveaux essais.

### 5.1 Choix expérimentaux et limites du modèle

- Animaux inclus

Le premier point de discussion de notre étude concerne les animaux inclus. Nous avons choisi des lapins New Zealand White car cette race est majoritairement employée dans les phases de recherche, en expérimentation animale. Cependant, aucune des publications réalisées chez le lapin et prises en exemple pour l'élaboration de nos protocoles ne fait état de la race des animaux utilisés. Même s'il n'existe pas de données précisant une susceptibilité plus ou moins accrue du sélénite de sodium chez le lapin en fonction de sa race, une telle possibilité est à envisager. Pour éviter ce biais, le cas échéant, toutes nos phases expérimentales ont été réalisées avec la même race.

De la même manière, le choix de l'âge des animaux a été sujet à questionnement. En effet, certaines publications ne mentionnent que le poids (« rabbits [...] weighing 1100±430g » Kabir et al., 2014), tandis que d'autres évoquent des animaux dont le ratio poids/âge semble aberrant (« adult rabbits aged about one year with a range of body weight of 1,5-2kg » Abdul Hussein & Alzubaidy, 2014 ; Abdul Hussein, 2015). En effet, d'après Morimoto (2009), un lapin New Zealand White d'environ 1100±430g est âgé de 5 à 7 semaines, et un lapin d'1,5 à

2kg devrait être âgé de 8 semaines environ. Ces informations ont orienté le choix de l'âge des lapins pour la phase 1, mais en l'absence de résultats avec de tels animaux nous avons ensuite opté pour des lapereaux de 7 jours pour la phase 2, afin de se rapprocher davantage du protocole d'Ostadalova. Quant aux injections intravitréennes (phases 3 et 4), elles ont été pratiquées avec des animaux de 5 à 8 semaines, pour des raisons pratiques (taille suffisante des globes oculaires pour des injections facilitées, sur des animaux adultes).

Enfin, des contraintes éthiques et des contraintes liées à la phase de recherche nous ont conduit à utiliser de petits effectifs lors des différentes phases. En effet les comités d'éthiques, en particulier depuis l'adoption de la règle des « Trois R » de Russel et Burch (Russel & Burch, 1959), recommandent l'utilisation du plus petit nombre d'animaux nécessaire (INSERM). De plus, le caractère précoce de l'élaboration du modèle expérimental chez le lapin ne nécessitait pas d'avoir recours à de plus grands effectifs.

- Sélénite de sodium

Plusieurs éléments peuvent être discutés, avec tout d'abord la qualité du produit. Le sélénite de sodium utilisé dans les phases expérimentales a été fourni par Sigma Aldrich, et des solutions fraîches ont été préparées pour chaque jour d'induction. Un certificat d'analyse a été fourni par Sigma Aldrich, garantissant de la qualité du produit, cependant aucune autre analyse qualité n'a été effectuée au cours de l'étude. Même si l'obtention de résultats nous permet de supposer une bonne efficacité de nos solutions, il aurait pu être intéressant de déterminer la stabilité de sélénite de sodium en solution, sa concentration effective dans chaque solution, et d'investiguer les effets potentiels de la filtration.

Ensuite, on peut se poser la question de l'efficacité du sélénite de sodium dans l'induction de la cataracte. En effet, la distribution du sélénite de sodium dans les érythrocytes et sa fixation sur les protéines plasmatiques après une injection sous-cutanée ont été documentées par McConnell et Cooper en 1950 (McConnell & Cooper, 1950). Ainsi transporté dans le sang, on peut supposer que le sélénite de sodium atteint rapidement les tissus oculaires afin de mettre en place la situation de stress oxydatif décrite chez le rat et nécessaire au développement de la cataracte. Chez le lapin, avec les résultats déjà obtenus, on suppose un mode d'action similaire, mais cela n'a jamais été étudié en détail.

- Choix des protocoles expérimentaux

En nous inspirant d'études existantes, nous avons choisi d'explorer trois techniques pour l'induction de la cataracte : un protocole de trois injections sous-cutanées à trois jours d'intervalle, un protocole d'injection sous-cutanée unique, et un protocole d'injection intravitréenne unique.

Le choix des doses et des volumes retenus pour ces trois protocoles est très lié au choix de l'âge des animaux pour les différentes phases, mentionné ci-dessus. Ainsi pour la phase 1, menée avec des animaux de 5 à 8 semaines, nous avons opté pour une dose répétée faible (1mg/kg), dans la mesure où les animaux plus âgés semblent avoir une moins bonne résistance au sélénite de sodium (Ostadalova et al., 1977). Face à l'absence de résultat, nous avons ensuite essayé une dose unique plus forte (3mg/kg) et une dose répétée intermédiaire (2mg/kg), avec des animaux d'âge identique. Là encore, l'absence de résultat et la mortalité plus importante nous ont finalement conduit à nous rapprocher du protocole initial d'Ostadalova, avec des lapereaux de 7 jours recevant une dose unique de 3mg/kg de sélénite de sodium. Quant aux injections intravitréennes, le choix des doses et du volume injectés a été inspiré des études préexistantes.

Les examens cliniques, les injections et les examens ophtalmologiques ont été réalisés tout au long de l'étude expérimentale par les deux mêmes personnes, deux vétérinaires disposant d'une formation aux principes de base et aux techniques principales d'ophtalmologie (examen à distance, examen rapproché, utilisation d'un ophtalmoscope et de la lampe à fente). D'une part ce nombre réduit permettait de limiter le biais opérateur, mais d'autre part, il s'est avéré être un facteur limitant à l'obtention de résultats optimaux (dans les cas où les cristallins étaient prélevés pour observation *ex vivo*, le manque d'opérateurs a conduit à un dessèchement des cristallins, et a donc entraîné une opacification artéfactuelle de ces derniers). Par ailleurs, le manque de pratique concernant le diagnostic ophtalmologique a également pu se poser comme facteur limitant de cette étude.

- Résultats

Nous avons déjà évoqué un certain nombre de biais concernant les publications ayant inspiré nos protocoles expérimentaux, et en particulier concernant l'authenticité de leurs résultats. En effet, ceux obtenus d'une publication à l'autre, les délais d'observation et les données chiffrées sont sujets à questionnement. Ces publications étant à la base de nos réflexions pour l'élaboration du modèle expérimental, on peut également se poser la question de la pertinence de nos résultats.

Néanmoins, dans la mesure où nous étions conscient de ces biais, nous avons œuvré à la réalisation de nos phases expérimentales avec le plus de rigueur possible dans le but d'obtenir des résultats exploitables. Si ces derniers paraissent plus modestes, ils permettent toutefois une marge de progression pour la mise en place d'un protocole de cataracte nucléaire stable, avec une mortalité minimale.

## **5.2 Perspectives d'amélioration**

Dans le cadre d'un protocole d'injection sous-cutanée unique, il serait intéressant de continuer à travailler avec des lapereaux de 7 jours, tout en utilisant des doses initiales plus élevées. En effet, nos résultats ont montré un début d'opacification avec une dose initiale de 3mg/kg, et dans la mesure où le sélénite de sodium semble mieux toléré par les individus jeunes, des résultats plus marqués pourraient sans doute être obtenus de cette manière. Chez le rat, le pouvoir cataractogène du sélénite de sodium est obtenu avec un minimum de mortalité pour des doses comprises entre 3,29 et 5,19mg/kg, plusieurs groupes d'étude pourraient ainsi être envisagés avec : 3mg/kg, 5mg/kg et un groupe contrôle négatif.

Dans le cadre d'injections intravitréennes uniques, le protocole mis en place semble correct, mais nécessiterait davantage d'opérateurs pour les prélèvements de cristallins et les observations *ex vivo*, le cas échéant. Il pourrait également être intéressant de disposer d'une expertise ophtalmologique afin de confirmer les observations réalisées par les opérateurs, voire de les former au cours des phases expérimentales.

Le protocole d'injections sous-cutanées répétées n'a pas été retenu dans la mesure où il faisait intervenir des animaux d'âge moyen (5-8 semaines) chez qui la sensibilité au sélénite de sodium était diminuée. Un tel protocole a été mis en place chez le rat, avec des animaux âgés de 13 jours lors de la première injection, privilégiant ainsi la toxicité chronique du sélénite de sodium plutôt que la toxicité aiguë (Huang et al., 1992). Chez le lapin, l'utilisation de ce protocole impliquerait d'accueillir une portée sous la mère, regroupant ainsi des animaux non sevrés mais ayant passé la période critique *post partum* de 10 jours. Ce modèle permettrait de séquencer plus précisément les événements qui précèdent l'opacification du cristallin, et ainsi d'améliorer les résultats tout en gardant un taux de mortalité très faible à partir du moment où les animaux sont manipulés avec précaution.

Enfin, comme évoqué précédemment, il pourrait être judicieux d'augmenter les contrôles qualité des solutions de sélénite de sodium préparées.

## CONCLUSION

Connue depuis l'Antiquité et aussi répandue chez l'homme que chez l'animal, la cataracte reste une des causes principales de cécité, et son incidence ne fait que croître du fait du vieillissement des populations et des progrès en termes de médecine humaine et de médecine vétérinaire. Les mécanismes accompagnant sa mise en place sont par ailleurs de mieux en mieux connus, même s'il persiste encore quelques zones d'ombre.

À l'heure actuelle, malgré l'existence de mesures prophylactiques ou de traitements médicamenteux symptomatiques, le seul traitement curatif disponible de cette affection reste la chirurgie.

Les premiers modèles d'induction de cataracte par le sélénite de sodium datent des années 1970 et concernent uniquement le rat. Ces modèles ont permis de comprendre les mécanismes de la pathogénie de la cataracte avant de s'intéresser à l'élaboration de traitements préventifs. La transposition de ces modèles chez le lapin s'est ensuite présentée comme une perspective intéressante en recherche ophtalmologique, avec notamment la possibilité de travailler avec des animaux dont l'anatomie oculaire est beaucoup plus proche de celle de l'homme.

Aujourd'hui, les résultats de l'étude expérimentale réalisée par la société Imavita montrent bien la possibilité de réaliser cette extrapolation, avec de plus l'opportunité d'utiliser plusieurs protocoles d'induction différents, même si ces derniers requièrent encore des améliorations. Avec des modèles stables, reproductibles et sécuritaires, des solutions efficaces au sujet de la cataracte seront plus facilement susceptibles d'être développées.



# ANNEXES

## Annexe 1. – Déroulement de la phase 1, étape 1 de l'étude expérimentale.

		J0	J3	J6
Lapin n°1	Date réelle de l'administration	29/02/2016	03/03/2016	07/03/2016
	Poids (g)	1176	1287	1432
	Nature de la solution administrée	Sélénite de sodium		
	Volume administré (mL)	1,2	1,3	1,4
	Concentration de la solution administrée (mg/mL)	1		
Lapin n°2	Date réelle de l'administration	29/02/2016	03/03/2016	07/03/2016
	Poids (g)	1005	1104	1233
	Nature de la solution administrée	Sélénite de sodium		
	Volume administré (mL)	1,0	1,1	1,2
	Concentration de la solution administrée (mg/mL)	1		
Lapin n°3	Date réelle de l'administration	01/03/2016*	03/03/2016	07/03/2016
	Poids (g)	884	995	1134
	Nature de la solution administrée	Sélénite de sodium		
	Volume administré (mL)	0,9	1,0	1,1
	Concentration de la solution administrée (mg/mL)	1		
Lapin n°4	Date réelle de l'administration	01/03/2016*	03/03/2016	07/03/2016
	Poids (g)	1024	1167	1330
	Nature de la solution administrée	Sélénite de sodium		
	Volume administré (mL)	1,0	1,2	1,3
	Concentration de la solution administrée (mg/mL)	1		

## Annexe 2. – Déroulement de la phase 1, étape 3 de l'étude expérimentale.

		J0	J3	J6
Lapin n°5	Date réelle de l'administration	25/03/2016	27/03/2016	30/03/2016
	Poids (g)	767	852	878
	Nature de la solution administrée	Sélénite de sodium		
	Volume administré (mL)	0,8	0,9	0,9
	Concentration de la solution administrée (mg/mL)	2		1
Lapin n°6	Date réelle de l'administration	25/03/2016	27/03/2016	/
	Poids (g)	769	861	/
	Nature de la solution administrée	Sélénite de sodium		
	Volume administré (mL)	0,8	0,9	/
	Concentration de la solution administrée (mg/mL)	2		/

**Annexe 3. – Déroulement des injections intravitréennes lors de la phase 3 de l'étude expérimentale.**

1. Mise en place d'une mydriase pharmacologique 1/3

**Tropicamide 0,5% Collyre** (Mydriaticum®) ; 1 goutte/œil

2. Prémédication – Pré-anesthésie, 20 minutes au moins avant l'anesthésie

Produit utilisé	Dose (mg/kg)	Volume (mL/kg)	Voie d'administration
<b>Robinul-V®</b> (Glycopyrrolate)	0,1	0,50	Injection sous cutanée
<b>Calmivet®</b> (Acépromazine)	1,0	0,20	
<b>Buprécare®</b> (Buprénorphine)	0,05	0,17	

3. Mise en place d'une mydriase pharmacologique 2/3

**Tropicamide 0,5% Collyre** (Mydriaticum®) ; 1 goutte/œil

4. Anesthésie

Produit utilisé	Dose (mg/kg)	Volume (mL)	Voie d'administration
<b>Rompun® 2%</b> (Xylazine)	4,0	0,20	Injection intra musculaire
<b>Imalgene® 1000</b> (Kétamine)	20	0,20	

5. Mise en place d'une mydriase pharmacologique 3/3

**Tropicamide 0,5% Collyre** (Mydriaticum®) ; 1 goutte/œil

6. Préparation de l'œil pour l'injection

Rinçage de l'œil avec du soluté physiologique

Mise en place d'une anesthésie locale (1/2) : **Tétracaïne 1%** (Tétracaïne Collyre Unidose®) ; 1 goutte/œil

Rinçage de l'œil avec du soluté physiologique

Antisepsie local prophylactique : nettoyage avec une solution de **povidone iodée 5%**

Rinçage de l'œil avec du soluté physiologique

Mise en place d'une anesthésie locale (2/2) : **Tétracaïne 1%** (Tétracaïne Collyre Unidose®) ; 1 goutte/œil

Rinçage de l'œil avec du soluté physiologique

Antisepsie local prophylactique : nettoyage avec une solution de **povidone iodée 5%**

7. Injection intravitréenne

Le lieu d'injection est repéré sur l'orbite de l'œil comme suit : 6-7h pour l'œil droit ; 5-6h pour l'œil gauche. Injection pratiquée 3 à 3,5mm en arrière du limbe, l'aiguille étant enfoncée jusqu'à 4 à 6mm de profondeur.

Matériel utilisé : NIPRO MYSHOT INSULIN SYRINGE 0,5mL with needle (size : 30 G)

8. Traitement antibiotique prophylactique

Application de **Tévémixine® Pommade** (Néomycine + Polymyxine B)

9. Suivi après réveil – 24h après injection

Application de **Tévémixine® Pommade** (Néomycine + Polymyxine B)



# BIBLIOGRAPHIE

ABDUL-HUSSEIN BA (2015). Effect of heparin sodium in protection of the lens against cataract induced with intravitreal injection of sodium selenite in rabbits. *International Journal of Scientific and Technology Research*. 4 : 367-375.

ABDUL-HUSSEIN BA and ALZUBAIDY AA (2014). Role of topically applied zinc sulfate in prevention of sodium selenite-induced cataract in rabbits. *International Journal of Advanced Research*. 2 : 1014-1022.

ADKINS Elizabeth A and HENDRIX DVH (2005). Outcomes of dogs presented for cataract evaluation: a retrospective study. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 41 : 235-240.

ALBERT Daniel M & JAKOBIEC Frederick A (2000). *Principles and practice of ophthalmology*. 2<sup>nd</sup> edition. Philadelphia, USA : WB Saunders Co. 5583p in 6 volumes. ISBN : 978-1-33622-9-976

ALKADER SHAKOOR DA and ALZUBAIDY AA (2016). The possible effect of bupropion (0,5%) eye drops against selenite induced cataract in rabbits. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 38.

ANDJELIC Sofija, DRASLAR K, HVALA A and HAWLINA M (2016). Anterior lens epithelium in intumescent white cataracts – scanning and transmission electron microscopy study. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 254 : 269-276.

ANDLEY Usha P (2007). Crystallins in the eye: Function and pathology. *Progress in Retinal and Eye Research*. 26 : 78-98.

ARTI Léa (2015). *Étiologie des cataractes dans l'espèce canine : étude rétrospective de 404 cas présentés à l'ENVA entre 2009 et 2012*. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine de Créteil – Paris. 121p.

AUGUSTEYN Robert C (2004). Alpha-crystallin: a review of its structure and function. *Clinical & Experimental Optometry*. 87 : 356-366.

BASSNETT Steven (2002). Lens organelle degradation. *Experimental Eye Research*. 74 : 1-6.

BERTHOUD Viviana M, and BEYER EC (2009). Oxidative stress, lens gap junctions, and cataracts. *Antioxidants & Redox Signaling*. 11 : 339-353.

BLOEMENDAL Hans, DE JONG W, JAENICKE R, LUBSEN NH, SLINGSBY C and TARDIEU A (2004). Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 86 : 407-85.

BOUHANNA Laurent (1999). Traitement de la cataracte chez les carnivores domestiques. Cahiers Cliniques. *L'Action Vétérinaire* [En ligne], n°1486. <http://www.laurentbouhanna.com/Gestion/publicationPDF/12.pdf>

BOUHANNA Laurent (2007). Chirurgie de la cataracte : les implants sont introduits par une ouverture très étroite. *La Semaine Vétérinaire* [En ligne], n°1287. <http://www.lepointveterinaire.fr/publications/la-semaine-veterinaire/article/n-1287/les-implants-sont-introduits-par-une-ouverture-tres-etroite.html>

BRENNAN Lisa A, MCGREAL RS and KANTOROW M (2012). Oxidative stress defense and repair systems of the ocular lens. *Frontiers in Bioscience*. 4 : 141-155.

CHARTIER Marie (2009). *Étiologie et pathogénie de la cataracte chez le chien et le chat*. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard – Lyon 1. 126 p.

CHYLACK LT, WOLFE JK, SINGER DM, LESKE MC, BULLIMORE MA, BAILEY IL, FRIEND, MCCARTHY D and WU SY (1993). The Lens Opacities Classification System III. The Longitudinal Study of Cataract Study Group. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)*. 111 : 831-836.

COUX Olivier et PIECHAZYK Marc (2000). Le système ubiquitine/protéasome : un ensemble (de) complexe(s) pour dégrader les protéines. *Médecine/Sciences*. 16 : 623-629.

DOGANAY Selim, BORAZAN M, IRAZ M and CIGREMIS Y (2006). The effect of resveratrol in experimental cataract model formed by sodium selenite. *Current Eye Research*. 31 : 147-153.

DUNCAN DD, SHUKLA OB, WEST SK and SCHEIN OD (1997). New objective classification system for nuclear opacification. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, Image Science, and Vision*. 14 : 1197-1204.

ENVT : École Nationale Vétérinaire de Toulouse. *Files* [En ligne]. Disponible sur : <http://www.envt.fr/sites/www.envt.fr/files/files/presentation/CATARACTE-ENVT.pdf>

Ellegaard Göttingen Minipigs. *Posters* [En ligne]. Disponible sur : [http://minipigs.dk/uploads/media/Intravitreal\\_administration\\_in\\_rabbit\\_and\\_minipig.pdf](http://minipigs.dk/uploads/media/Intravitreal_administration_in_rabbit_and_minipig.pdf)

FLORANCEAU Philippe (2002). *L'œil et les pathologies oculaires chez le lapin domestique*. Thèse de doctorat vétérinaire, Université Paul-Sabatier - Toulouse 3. 121 p.

FRIS Miroslav, TESSEM MB, SAETHER O and MIDELFART A (2006). Biochemical changes in selenite cataract model measured by high-resolution MAS H NMR spectroscopy. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. 84 : 684-692.

GERVAIS Isabelle (2007). *Contribution à l'étude de la cataracte dans l'espèce équine*. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine de Créteil. 114 p.

GILGER BC, MALOK E, CUTTER KV, STEWART T, HOROHOV DW and ALLEN JB (1999). Characterization of T-Lymphocytes in the Anterior Uvea of Eyes with Chronic Equine Recurrent Uveitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 71 : 17-28.

GOODENOUGH Daniel A, and PAUL DL (2003). Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 4 : 285-294.

GREWAL DS, BRAR GS and GREWAL SPS (2009). Correlation of nuclear cataract lens density using Scheimpflug images with Lens Opacities Classification System III and visual function. *Ophthalmology*. 116 : 1436-1443.

GWON Arlene (2008). The Rabbit in Cataract/IOL Surgery. In : A. *Animal Models In Eye Research*. 1st édition. Dayton, OH, USA : Academic Press – Elsevier. p. 199-219. ISBN: 978-0-12-374169-1

HEJTMANCIK JF, RIAZUDDIN SA, MCGREAL R, LIU W, CVEKL A and SHIELS A (2015). Lens Biology and Biochemistry. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 134 : 169-201.

HORWITZ J, BOVA MP, DING LL, HALEY DA and STEWART PL (1999). Lens alpha-crystallin: function and structure. *Eye (London, England)*. 13 : 403-8.

HORWITZ Joseph (1992). Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89 : 10449-10453.

HUANG LL, ZHANG CY, HESS JL and BUNCE GE (1992). Biochemical changes and cataract formation in lenses from rats receiving multiple, low doses of sodium selenite. *Experimental Eye Research*. 55 : 671-678.

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité. *Fiches toxicologiques* [En ligne]. [http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX\\_150](http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_150)

INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. *L'expérimentation animale* [En ligne]. Disponible sur : <http://extranet.inserm.fr/index.php/recherche-pre-clinique/l-experimentation-animale/la-regle-des-3-r-reduire-raffiner-remplacer>

KABIR F, FATTAHIAN H, RIAZI-ESFEHANI M, VESHKINI A, and VAZIR B (2014). The Protective Role of Silymarine on Selenite-Induced Cataract in Rabbit Model. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*. 20 : 139-143.

KARTH Peter and BLUMENKRANZ MS (2014). Update on intravitreal Injection Techniques. *Review of Ophthalmology* [En ligne]. <https://www.reviewofophthalmology.com/article/update-on-intravitreal-injection-techniques>

KISTLER J et BULLIVANT S (1989). Structural and molecular biology of the eye lens membranes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 24, n° 2, 151-81.

KUSZAK JR, ZOLTOSKI RK, and TIEDEMANN CE (2004). Development of lens sutures. *The International Journal of Developmental Biology*. 48 : 889-902.

KYSELOVA Zuzana (2010). Different experimental approaches in modelling cataractogenesis: An overview of selenite-induced nuclear cataract in rats. *Interdisciplinary Toxicology*. 3 : 3-14.

LEBAS François (2008). *La biologie du lapin ; Chapitre 9 : L'œil et la vision chez le lapin* [En ligne]. Disponible sur : <http://www.cuniculture.info/Docs/Biologie/biologie-09.htm>

MATHIAS Richard T, WHITE TW and GONG X (2010). Lens gap junctions in growth, differentiation, and homeostasis. *Physiological Reviews*. 90 : 179-206.

McCONNELL KP and COOPER BJ (1950). Distribution of selenium in serum proteins and red blood cells after subcutaneous injection of sodium selenite containing radioselenium. *Journal of Biological Chemistry*. 183 : 459-466.

MICHAEL R and BRON AJ (2011). The ageing lens and cataract: a model of normal and pathological ageing. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 366 : 1278-1292.

MONNEREAU L et BARTHELEMY P (2000). Développement et organisation générale du bulbe de l'œil chez le lapin domestique. *Revue de Médecine Vétérinaire* [En ligne]. Vol. 12, Tome 151, 1119-1130. [http://www.revmedvet.com/2000/RMV151\\_1119\\_1130.pdf](http://www.revmedvet.com/2000/RMV151_1119_1130.pdf)

MORIMOTO Masashi (2009). General Physiology of Rabbits. *Rabbit Biotechnology: Rabbit genomics, transgenesis, cloning and models*. 1ere édition. Springer, edited by LM HOUDEBINE and J FAN. p. 27-35. ISBN : 978-9-04818-476-7

NAHOMI Rooban B, WANG B, RAGHAVAN CT, VOSS O, DOSEFF AI, SANTHOSHKUMAR P and NAGARAJ RH (2013). Chaperone Peptides of  $\alpha$ -Crystallin Inhibit Epithelial Cell Apoptosis, Protein Insolubilization, and Opacification in Experimental Cataracts. *The Journal of Biological Chemistry*. 288 : 13022-13035.

OLLIVIER Franck. *Clinique vétérinaire d'Ophtalmologie à Montréal* [En ligne]. Disponible sur : <http://ophtalmoveterinaire.com/wp-content/uploads/2016/02/Ophtalmo-Veterinaire-La-Cataracte-chez-le-chien.pdf>

OSTADALOVA I, BABICKY A and OBENBERGER J (1977). Cataract induced by administration of a single dose of sodium selenite to suckling rats. *Experientia*. 34 : 222-223.

PATEL Alpa S and SAHU S (2016). Morgagnian Cataract. *American Academy of Ophthalmology* [En ligne]. [http://eyewiki.aao.org/Morgagnian\\_Cataract](http://eyewiki.aao.org/Morgagnian_Cataract)

POLLREISZ Andreas and SCHMIDT-ERFURTH U (2010). Diabetic cataract-pathogenesis, epidemiology and treatment. *Journal of Ophthalmology*. 608751.

- QI Hui-Ping, WEI SQ, ZHANG LQ, GAO XC, YU NN, BI S and CUI H (2013). Preventive effect of danshensu on selenite-induced cataractogenesis in cultured rat lens. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. 41 : 172-179.
- RAMAN Rajiv, PAL SS, ADAMS JSK, RANI PK, VAITHEESWARAN K and SHARMA T (2010). Prevalence and risk factors for cataract in diabetes: Sankara Nethralaya Diabetic Retinopathy Epidemiology and Molecular Genetics Study, report no. 17. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 51 : 6253-6261.
- RÉGNIER A (2013-2014). Ophtalmologie du chien et du chat (1<sup>ère</sup> Partie). *Ophtalmologie A3 ENVT*.
- RUSSELL NJ, ROYLAND JE, McCAWLEY EL and SHEARER TR (1984). Ultrastructural study of selenite-induced nuclear cataracts. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 25 : 751-757.
- RUSSELL WMS and BURCH RL (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*. 1st edition. London : Methuen & Co., Ltd. 238p. ISBN : 978-0-90076-778-4
- SAPIENZA JS, SIMO FJ and PRADES-SAPIENZA A (2000). Golden Retriever Uveitis: 75 Cases (1994-1999). *Veterinary Ophthalmology*. 3 : 241-246.
- SCHEY KL, WANG Z, WENKE JL and QI Y (2014). Aquaporins in the eye: expression, function, and roles in ocular disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1840 : 1513-1523.
- SHANG Fu and TAYLOR A (2004). Function of the ubiquitin proteolytic pathway in the eye. *Experimental Eye Research*. 78 : 1-14.
- SHEARER TR and DAVID LL (1982). Role of calcium in selenium cataract. *Current Eye Research*. 2 : 777-784.
- SHEARER TR, MA H, FUKIAGE C and AZUMA M (1997). Selenite nuclear cataract: review of the model. *Molecular Vision*. 3.
- SLATTER Douglas H (1981). *Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. 1st Edition. Philadelphia, USA : W B Saunders Co. ISBN : 978-0-72168-357-7.
- SLINGSBY Christine, WISTOW GJ and CLARK AR (2013). Evolution of crystallins for a role in the vertebrate eye lens. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. 22 : 367-380.
- SPARROW JM, BRON AJ, BROWN NAP, AYLIFFE W and HILL AR (1986). The Oxford Clinical Cataract Classification and Grading System. *International Ophthalmology*. 9 : 207-225.
- SREELAKSHMI V and ABRAHAM A (2016). Age related or senile cataract: pathology, mechanism and management. *Austin Journal of Clinical Ophtalmology*. 3 : 1067.
- THOMSON JA, and AUGUSTEYN RC (1989). On the structure of alpha-crystallin: construction of hybrid molecules and homopolymers. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 994 : 246-252.

THYLEFORS B, CHYLACK LT, KONYAMA K, SASAKI K, SPERDUTO R, TAYLOR HR, WEST S and WHO Cataract Grading Group (2002). A simplified cataract grading system. *Ophthalmic Epidemiology*. 9 : 83-95.

VAN PRAAG Esther (2003-2017). *Cataract in rabbits* [En ligne]. Disponible sur : [http://www.medirabbit.com/EN/Eye\\_diseases/Disorder/Cat/Cat\\_en.htm](http://www.medirabbit.com/EN/Eye_diseases/Disorder/Cat/Cat_en.htm)

VARMA SD, DEVAMANO HARAN PS and MORRIS SM (1995). Prevention of cataracts by nutritional and metabolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 35 : 111-129.

WILKIE David A (2013). The Ophthalmic Examination as It Pertains to General Ocular Toxicology: Basic and Advanced Techniques and Species-Associated Findings. In *Ocular Pharmacology and Toxicology*. 1st edition. Totowa, NJ : Humana Press, edited by Brian C. GILGER, 143-203. ISBN : 978-1-62703-744-0

WILLIAMS David (2007). Rabbit and rodent ophthalmology. *European Journal of Companion Animal Practice*. 17 : 242-252.

ZAROOUR Florian (2016). *Prévention et traitement de la cataracte*. Thèse de doctorat de pharmacie, Université Paul Sabatier – Toulouse 3. 167p.

ZHAO Ling et al. (2015). Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts. *Nature*. 523 : 607-611.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

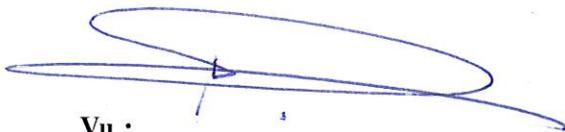
Je soussigné, Alain REGNIER, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **BLAAUW Anouk** intitulée « **Elaboration d'un modèle expérimental de cataracte sénile induite au sélénite de sodium chez le lapin sain.** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.



Fait à Toulouse, le 24 janvier 2017  
Professeur émérite Alain REGNIER  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



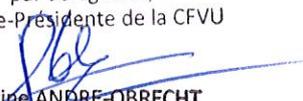
Vu :  
La Directrice de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Isabelle CHMITELIN



Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Pierre FOURNIE

Vu et autorisation de l'impression :  
Président de l'Université  
Paul Sabatier  
Monsieur Jean-Pierre VINEL

Le Président de l'Université Paul Sabatier  
par délégation,  
La Vice-Présidente de la CFVU



Régine ANDRE-OBRECHT

Mme BLAAUW Anouk  
a été admis(e) sur concours en : 2011  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2015  
a validé son année d'approfondissement le : 03/11/2016  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Toulouse, 2017

**Nom :** BLAAUW

**Prénom :** Anouk

**Titre : ÉLABORATION D'UN MODÈLE EXPÉRIMENTAL DE CATARACTE SÉNILE INDUITE AU SÉLÉNITE DE SODIUM CHEZ LE LAPIN SAIN**

La cataracte se présente comme une opacification suffisamment dense et étendue du cristallin pouvant entraîner une perte de sa transparence, et à terme conduire à une altération de la vision. Cette affection représente la première cause de cécité chez l'homme, et l'une des principales causes de cécité chez l'animal domestique. À l'heure actuelle, le seul traitement curatif est chirurgical. Le coût important de ces interventions a récemment poussé quelques études à s'intéresser à des alternatives médicamenteuses, dont le développement repose sur l'utilisation de modèles expérimentaux adéquats.

Différents modèles expérimentaux d'induction de cataracte réalisés entre 1977 et 2016 chez le rat et le lapin ont été revus et regroupés. Ce travail présente ensuite les résultats d'une étude menée par la société Imavita afin de développer un modèle expérimental de cataracte nucléaire permanente induite au sélénite de sodium chez le lapin sain.

Avec plusieurs protocoles successivement développés, il apparaît donc possible d'induire une cataracte chez les lapins de l'étude. Ces modèles nécessitent encore des améliorations pour être stables, reproductibles et sûrs, mais ils ouvrent la voie pour trouver de nouvelles solutions face à la cataracte.

**Mots-Clés :** cataracte – lapin – sélénite de sodium – modèle expérimental

---

**Title: DEVELOPMENT OF AN EXPERIMENTAL MODEL OF SELENITE-INDUCED SENILE CATARACT IN HEALTHY RABBITS**

A cataract is a sufficiently dense and extended clouding of the eye lens that may result in the loss of its transparency, and lead to the alteration of the vision. This condition is the most common cause of blindness in man, and one of the main causes of blindness in domestic animals. At the present time, surgery remains the only curative treatment to remove a cataract. The significant cost of these surgeries recently got a few studies interested in medicinal alternatives whose development relies on the use of suitable experimental models.

Different experimental models for the induction of cataract developed between 1977 and 2016 in rats and rabbits have been reviewed and gathered. Then, this work presents the results of a study conducted by Imavita in an attempt to develop an experimental model of selenite-induced permanent nuclear cataract in healthy rabbits.

A few protocols developed one after another showed it seemed possible to produce a cataract in the rabbits of the study. These models still need improvement to be stable, reproducible and safe, but they hold promises for further research on the treatment of cataracts.

**Key Words:** cataract – rabbit – sodium selenite – experimental model