

Université de Montréal

**Effet de divers agents en application locale sur la  
concentration des métalloprotéinases 2 et 9 dans le film  
de larmes canin normal**

par

Simon Couture

Département des sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires  
option sciences cliniques

Juin, 2005

© Simon Couture, 2005



SF

607

U54

2006

v.036

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Effet de divers agents en application locale sur la concentration des  
métalloprotéinases 2 et 9 dans le film de larmes canin normal**

présenté par :  
Simon Couture

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr André Bisailon, président-rapporteur  
Dr Michel Carrier, directeur de recherche  
Dre Michèle Doucet, co-directrice  
Dr Pierre Hélie, membre du jury

## Résumé

**Objectif:** Ce mémoire a pour but d'évaluer l'effet de différents agents couramment utilisés pour le traitement des ulcères cornéens gélatinisants du chien, sur l'activité des gélatinases présentes dans le film de larmes canin normal. **Méthode :** Huit chiens Beagle adultes sans pathologie oculaire ont reçu alternativement les agents suivants : cyclosporine A 1%, N-acétylcystéine 10%, ciprofloxacine 0,3%, EDTA 1%, doxycycline 0,001%, glycosaminoglycans polysulfatés (GAGPS) 5%, autosérum et larmes artificielles. Les échantillons de larmes ont été récoltés à l'aide de pipettes micro-capillaires à quatre moments prédéterminés ( $t_0$ ;  $t_{24h}$ ;  $t_{49h}$ ;  $t_{54h}$ ). Les activités basales et latentes des gélatinases furent ensuite évaluées à partir de la densité optique obtenue par une trousse de détection commerciale des gélatinases (mesurée par un spectrophotomètre). À partir d'un ratio de densité optique, une mesure semi-quantitative de l'activité des gélatinases a été obtenue. **Résultats:** Une activité basale et une latente furent mesurées dans tous les échantillons. L'activité enzymatique totale la plus faible fut observée une heure après le dernier traitement dans sept des huit agents; EDTA (-68%), ciloxan (-76%), cyclosporine A (-68%), doxycycline (-47%), larmes artificielles (-26%), GAGPS (-25%) et N-acétylcystéine (-20%). Toutefois, seule la réduction observée avec l'EDTA six heures après le dernier traitement fut significativement plus faible que la réduction observée dans le groupe contrôle. **Conclusion:** Même si les agents employés dans cette étude sont reconnus pour réduire l'activité des gélatinases *in vitro*, seule l'EDTA a permis de réduire significativement de façon persistante l'activité des gélatinases. Des études supplémentaires sont toutefois nécessaires afin d'évaluer le potentiel de l'EDTA et des autres agents en condition ulcéreuse.

**Mots-clés :** gélatinases, métalloprotéinases, collagénase, kératite ulcéreuse gélatinisante, canin, EDTA, autosérum, cyclosporine A

## Abstract

*Objective:* To evaluate the topical effect of various agents, currently used in the treatment of melting corneal ulcers, on gelatinases activity present in the tear film of normal dogs.

*Subjects:* Eight normal adult Beagle dogs *Procedures:* Each animal received the following agents: cyclosporine A 1%, N-acetylcysteine 10%, ciprofloxacin 0.3%, EDTA 1%, doxycycline 0.001%, polysulfated glycosaminoglycans (PSGAG) 5%, autoserum and artificial tears during a 48 hour period following a latin square design. Tear samples were collected with microcapillary pipettes following a corneal surface irrigation of each eye with sterile saline at four different times ( $t_0$ ;  $t_{24h}$ ;  $t_{49h}$ ;  $t_{54h}$ ). Basal and total gelatinase activities were evaluated by optical density after processing in a commercial gelatinase activity assay. From the optical density ratio, a semi-quantitative measure of gelatinase activity was obtained. Basal and total activities were measured in all samples. *Results:* The lowest total gelatinase activity, representing a percent decline in the enzyme activity, was observed one hour after the last treatment in seven out of the eight ophthalmics agents; EDTA (68%), ciprofloxacin (76%), cyclosporine A (68%), doxycycline (47%), artificial tears (26%), PSGAG (25%) and N-acetylcysteine (20%). However, only the reduction observed with EDTA six hours after the last treatment was significantly lower compared to the reduction observed with the artificial tears. *Conclusion:* This study indicated that only EDTA was able to significantly reduce the gelatinase activity in a persistent manner in the tear film of normal canine eyes. Further studies will be required to evaluate the potential effect of EDTA and other agent under ulcerative conditions.

**Keywords:** gelatinases, metalloproteinases, collagenase, melting, keratitis, corneal ulcer, canine, EDTA, autoserum, cyclosporine A.

# Table des matières

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1: La cornée .....	2
1.1 Anatomie et structure .....	2
1.2 Processus de guérison de la cornée .....	6
1.3 Mécanisme de défense et immunité cornéenne.....	9
CHAPITRE 2: Le film lacrymal .....	11
2.1 Fonction générale .....	11
2.2 Composition et structure .....	12
2.2.1 Couche lipidique .....	13
2.2.2 Couche aqueuse.....	13
2.2.3 Couche interne .....	14
2.3 Dynamique .....	15
2.4 Méthode de prélèvement et conservation des échantillons .....	16
CHAPITRE 3: Métalloprotéinases.....	19
3.1 Caractéristiques générales .....	19
3.1.1 Structure moléculaire et catégories des MMPs .....	19
3.1.2 Régulation enzymatique.....	21
3.1.4 Rôles physiologiques et pathologiques généraux .....	21
3.2 Détection et analyse des métalloprotéinases .....	22
CHAPITRE 4: Pathophysiologie des kératites ulcératives .....	25
4.1 Kératite ulcérate simple .....	25
4.1.1 Symptomatologie .....	25
4.1.2 Diagnostic .....	26
4.2 Kératites ulcératives compliquées.....	26
4.2.1 Implication des enzymes et des cytokines .....	29
4.3 Approche thérapeutique recommandée des kératites ulcératives compliquées .....	33
4.3.1 Approche médicale.....	33

CHAPITRE 5: Pharmacologie oculaire .....	37
5.1 Voie d'administration pour le segment antérieur .....	37
5.2 Dynamique : absorption, métabolisme et élimination .....	37
5.2.1 Facteurs influençant la pénétration oculaire .....	38
5.3 Inhibiteurs enzymatiques étudiés .....	41
5.3.1 EDTA .....	42
5.3.2 Cyclosporine A .....	42
5.3.3 N-acétylcystéine .....	44
5.3.4 Doxycycline .....	45
5.3.5 Autosérum .....	46
5.3.6 Glycosaminoglycans polysulfatés .....	47
5.3.7 Ciprofloxacine (Ciloxan®) .....	48
CHAPITRE 6: Méthodologie.....	49
6.1 Choix des sujets .....	49
6.2 Design de l'étude.....	49
6.3 Récolte des échantillons.....	51
6.4 Analyse de l'activité des gélatinases.....	52
6.5 Analyses statistiques .....	54
CHAPITRE 7: Résultats (Article accepté par <i>Veterinary Ophthalmology</i> ).....	55
CHAPITRE 8: Analyse des résultats et discussion.....	64
8.1 Activité enzymatique des métalloprotéinases: Généralités.....	64
8.1.1 Pourquoi avoir choisi l'ensemble commercial de détection des gélatinases ?....	64
8.1.2 Influence des préparations ophtalmiques .....	66
8.1.3 Influence de la technique de récolte.....	66
8.1.4 Analyse des résultats pour les protéines totales .....	69
8.1.5 Corrélation selon le sexe des sujets.....	71
8.1.6 Pourquoi avoir choisi le modèle non ulcéré? .....	71
8.2 Activité enzymatique des gélatinases: Résultats.....	72



8.2.1	Corrélation entre l'activité de base vs l'activité totale.....	72
8.2.2	Évolution de l'activité relative de base .....	72
8.2.3	Évolution de l'activité relative totale .....	73
8.2.4	Constatations générales.....	81
CONCLUSION.....		83
BIBLIOGRAPHIE.....		84

## Liste des tableaux

Tableau I	Catégories principales des MMPs et leurs caractéristiques.....	20
Tableau II	Liste des agents étudiés.....	49
Tableau III	Répartition des traitements sur 8 semaines.....	50
Tableau IV	Séquence d'administration des traitements et des prélèvements.....	51
Tableau V	<i>Table 1. Means and standard deviations for basal and total gelatinase relative activity for each treatment group at different time point</i> .....	59

## Liste des figures

Figure 1	Schéma des différentes couches retrouvées dans la cornée.....	2
Figure 2	Coupe transversale de l'épithélium antérieur cornéen.....	3
Figure 3	Guérison d'une lésion épithéliale simple.....	7
Figure 4	Composition du film de larmes.....	13
Figure 5	Principales glandes lacrymales du chien.....	14
Figure 6	Illustration des rôles extracellulaires multiples des MMPs.....	22
Figure 7	Illustration d'une zymographie.....	23
Figure 8	Illustration théorique de la détection des gélatinases par l'ensemble de détection commercial.....	24
Figure 9	Progression d'un ulcère cornéen simple et compliqué.....	27
Figure 10	Exemple de l'interaction des cytokines et des enzymes.....	29
Figure 11	Origine et distribution des MMPs lors de lésion cornéenne.....	31
Figure 12	Modèle de compartimentalisation de la pharmacocinétique lors de l'application topique oculaire.....	38
Figures 13-14-15	Technique employée pour récolter les échantillons.....	52
Figure 16	<i>Figure 1. Tear samples were collected with 25µl capillary tubes following a corneal surface irrigation of each eye with sterile saline from the lateral canthus, avoiding touching and traumatizing corneal and conjunctiva epithelium.....</i>	58
Figure 17	<i>Figure 2. Graph representing mean change and standard deviation of total gelatinase activity versus baseline.....</i>	59
Figure 18	<i>Figure 3. Graph representing means for basal and total gelatinase relative activity versus time.....</i>	60

## Liste des sigles et des abréviations

$\mu\text{g}$	microgramme
$\mu\text{l}$	microlitre
$\mu\text{m}$	micromètre
ADN	acide désoxyribonucléique
al.	et collaborateurs
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (analyse de variances)
APMA	acétate p-aminophénylmercurique
BCA	acide bicinchoninique (analyse des protéines)
$\text{Ca}^+$	calcium
EDTA	éthylènediamine tétra-acétique
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (facteur de croissance de l'épiderme)
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> (facteur de croissance des fibroblastes)
GAGPS	glycosamynoglycans polysulfatés
gt	goutte
IFN- $\gamma$	interféron gamma
IgA	immunoglobulines A
IL-1( $\beta$ )	interleukine-1 (beta)
IL-2	interleukine-2
kg	kilogramme
mg	milligramme
ml	millilitre
mmol	millimole
MMP (s)	métalloprotéinase (s)
MMP-*	métalloprotéinases-* (* correspond à un nombre)
mOsm	milliosmole
MT-MMP(s)	<i>Membrane-type matrix metalloproteinases</i>
$\text{Na}^+/\text{K}^+$	pompe sodium/potassium

NaCl	chlorure de sodium
ng	nanogramme
nm	nanomètre
°C	degré Celsius
OU	<i>oculus uterque</i> (dans les 2 yeux)
PAF	<i>platelet activating factor</i> (facteur d'activation plaquettaire)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (amplification en chaîne par polymérase)
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> (facteur de croissance dérivé des plaquettes)
PMN (s)	polymorphonucléaire (s)
PSGAG	<i>polysulfated glycosaminoglycans</i> (glycosaminoglycans polysulfatés)
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-beta</i> (facteur de transformation cellulaire-beta)
TIMP (s)	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TNF- $\alpha$	<i>tumor necrosis factor-alpha</i> (facteur onconécrosant-alpha)
TPA	<i>tissue plasminogen activator</i> (activateur tissulaire du plasminogène)
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (facteur de croissance des cellules vasculaires endothéliales)
Zn <sup>+</sup>	zinc

*À la volonté d'aller jusqu'au bout...*

*À ma blonde, mon chien, mon chat, mes  
poissons et tous ceux et celles qui ont une  
paire de yeux!*

## Remerciements

L'auteur tient à exprimer sa gratitude à M. Guy Beauchamp pour son aide lors de l'analyse statistique et tous les gens ayant participé de près et de loin aux manipulations techniques. Cette étude a été possible grâce au support financier du Fond du Centenaire, Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. Je remercie aussi le Fond de Recherche sur la Nature et les Technologies du Gouvernement du Québec, la compagnie *Pfizer* Canada Inc., la Faculté de médecine vétérinaire et la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal pour leur support financier. Finalement, je remercie grandement la Dre Johanne Martel-Pelletier, François Mineau et les autres membres du laboratoire Arthrolab, CHUM-Pavillon Notre-Dame Montréal, Québec, Canada pour leur support technique et leurs précieux conseils.

## Introduction

La kératite ulcérate est une inflammation stérile ou infectée de la cornée associée à une perte de l'épithélium cornéen superficiel, résultant en une excavation locale. L'absence de traitement adéquat peut entraîner des dommages permanents qui nuisent à la vision (Nasissse, 1996).

Chez le chien, les ulcères compliqués sont surtout retrouvés chez les races brachycéphales ou lagophthalmiques étant donné une exposition chronique de la cornée et une moins bonne protection. D'autres pathologies oculaires telles la kératoconjonctivite sèche, la kératite bactérienne, les cils ectopiques ou l'entropion peuvent aussi prédisposer aux ulcères cornéens (Nasissse, 1996). Lors de kératite ulcérate compliquée, la présence simultanée de différents facteurs engendre la libération d'enzymes et de toxines qui causent une destruction cornéenne majeure (Whitley et Gilger, 1999). Ainsi, les principaux objectifs thérapeutiques recherchés sont de limiter l'invasion bactérienne avec une antibiothérapie à large spectre, de limiter les spasmes de l'iris et du corps ciliaire avec l'utilisation d'un parasympatholytique, et de ralentir le processus catalytique des métalloprotéinases par une neutralisation enzymatique et ainsi optimiser la guérison (Nasissse, 1996). Cette neutralisation enzymatique demeure cependant difficile à obtenir et l'efficacité des agents utilisés demeure à être démontrée due au manque d'études expérimentales *in vivo*.

Dans ce projet, nous nous sommes intéressés au potentiel inhibiteur de certains agents couramment utilisés dans le traitement de la kératite ulcérate compliquée chez le chien pour réduire l'activité enzymatique des métalloprotéinases. Nous voulions ainsi déterminer l'effet *in vivo* de certains agents sur l'activité des gélatinases comparativement à celui des larmes artificielles.



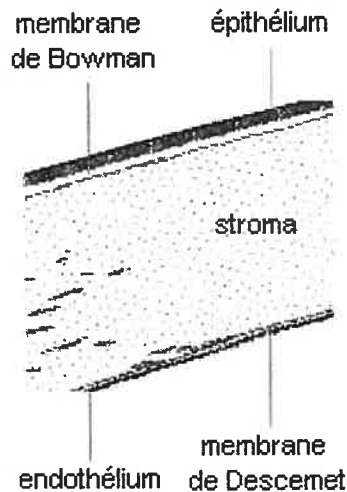
# CHAPITRE 1: La cornée

La cornée est le segment antérieur et transparent de la tunique fibreuse de l'œil. Sa nature, sa composition et sa structure lui confèrent les propriétés pour supporter et protéger le contenu intra-oculaire, mais aussi pour transmettre la lumière à la rétine. Alors que la protection et la réfraction lumineuse sont comblées passivement par la cornée, la transparence est maintenue de façon active (Sherrard, 1977). Afin de mieux saisir comment la cornée remplit ces fonctions et comment elle répond aux dommages qui lui sont causés, il sera question dans un premier temps de décrire sa composition, pour ensuite discuter des différents mécanismes qui permettent de maintenir son homéostasie et son intégrité tissulaire.

## 1.1 Anatomie et structure

La cornée est composée dans l'ordre de cinq couches aux caractéristiques individuelles particulières: l'épithélium antérieur, la membrane de Bowman, le stroma cornéen, la membrane de Descemet, et l'endothélium (figure 1).

Figure 1. Schéma des différentes couches retrouvées dans la cornée

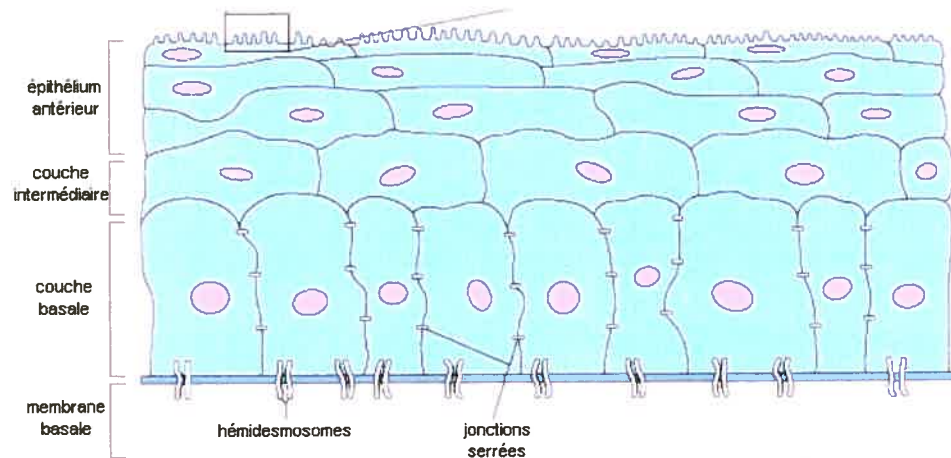


Modifié à partir de Yanoff et Duker (2004)

L'épithélium antérieur hydrophobique est formé de trois sous-couches. La couche plus superficielle est composée de deux à trois épaisseurs de cellules pavimenteuses non-

kératinisées. La sous-couche intermédiaire et la sous-couche basale se composent de cellules polyédriques mais dans le deuxième cas, les cellules sont allongées (voir figure 2). Cette dernière couche repose sur la membrane basale qui joue un rôle majeur dans l'adhérence de l'épithélium aux structures sous-jacentes tel que le stroma cornéen (Hogan, Alvarado et Weddell, 1971; Samuelson, 1999; Sherrard, 1977).

Figure 2. Coupe transversale de l'épithélium antérieur cornéen



Modifié à partir de Yanoff et Duker (2004)

L'épithélium antérieur est solidement ancré dans la membrane de Bowman ou directement dans le stroma antérieur lorsque cette première est absente, au moyen d'hémidesmosomes, de fibres de collagènes d'ancrage, majoritairement de type IV, et des glycoprotéines (Smolek et Klyce, 1993; Hogan, Alvarado et Weddell, 1971). Les cellules épithéliales de la sous-couche basale parviennent à remplacer l'épithélium cornéen en entier tous les sept à quatorze jours. Toutefois, lorsque la membrane basale est détruite, plusieurs semaines peuvent être nécessaires pour remplacer l'épithélium, soit le temps nécessaire pour réparer la membrane basale lésée (Wilkie et Whittaker, 1997; Gelatt et Samuelson, 1982).

La membrane de Bowman est presque toujours absente chez le chien (Samuelson, 1999). Lorsqu'elle est présente, sa composition diffère légèrement du stroma cornéen auquel elle

est intimement liée par des fibrilles de collagène (Hogan, Alvarado et Weddell, 1971; Gordon et al., 1994; Samuelson, 1999)

Le stroma cornéen constitue 90% de l'épaisseur de la cornée et est composé à 75-85% d'eau (Samuelson, 1999; Sherrard, 1977; Hogan, Alvarado et Weddell, 1971). Le reste du stroma est composé de fibrilles de collagène parallèles qui se faufilent entre les kératocytes et les glycoprotéines (Samuelson, 1999; Sherrard, 1977). Leur arrangement, leur orientation et leur diamètre sont d'une homogénéité qui contribue à rendre la cornée transparente (Sherrard, 1977; Hogan, Alvarado et Weddell, 1971). Lors de dommages cornéens, les kératocytes se transforment en fibroblastes qui produisent un tissu cicatriciel contenant des fibrilles de collagène moins homogènes et au diamètre plus important que ceux retrouvés dans le stroma cornéen normal. Il en résulte un tissu non transparent semblable au collagène que l'on retrouve dans la sclérotique (Samuelson, 1999; Hogan, Alvarado et Weddell, 1971).

Cinq types de collagène sont retrouvés dans le stroma en association avec la matrice extracellulaire: les types I, III, V, VI et XII (Nakamura et al., 1994; Takahashi et al., 1993; Doane, Yang et Birk, 1992; Zhan, Burrows et Cintron, 1995; Cintron et Covington, 1990). Le type I est le plus abondant et forme les lamelles de collagène principales (Samuelson, 1999).

La clarté cornéenne est associée à un état de faible hydratation du stroma (Samuelson, 1999; Sherrard, 1977). Cet état de « déturgescence » est maintenu grâce à l'action constante des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  retrouvées dans l'épithélium cornéen, mais surtout dans l'endothélium cornéen. Une altération dans la composition des glycosaminoglycans ou une carence en glucose dans l'environnement cornéen affecte le fonctionnement des pompes et secondairement l'état d'hydratation (Glenwood, Gelatt et Ofri, 1999; Samuelson, 1999; Sherrard, 1977). La recherche a démontré que le retrait de l'épithélium cornéen a engendré

une augmentation par hydratation de 200% de l'épaisseur de la cornée après 24 heures, alors que le retrait de l'endothélium cornéen a provoqué un épaissement de 500% de la cornée (Watsky, Olsen et Edelhauser, 1995).

La membrane de Descemet est une structure fibreuse homogène et acellulaire dont le rôle est de protéger la face interne de la cornée. Cette structure sous tension est d'apparence élastique mais ne contient que de fines fibrilles de collagène de type I, III, IV, V, VI et VIII (Jakus, 1956; Tamura et al., 1991). Elle est tout à fait distincte du stroma cornéen.

Enfin l'endothélium, le segment le plus interne de la cornée, est une couche cellulaire simple et riche en organelles. La densité est d'environ 3000 cellules/mm<sup>2</sup> chez les jeunes chiots et décroît avec l'âge. Une baisse trop importante peut engendrer une défaillance de l'état cornéen (Samuelson, 1999) et affecter la transparence de la cornée. Malheureusement, son pouvoir de régénération est très faible. Des mitoses surviennent en bas âge mais sont rare à l'âge adulte (Hogan, Alvarado et Weddell, 1971).

L'absence de vaisseaux sanguins contribue à la transparence de la cornée. L'apport nutritif et l'excrétion des déchets métaboliques sont assurés par le film de larmes cornéen, l'humeur aqueuse et les vaisseaux épiscléraux, scléraux et conjonctivaux (Samuelson, 1999; Hogan, Alvarado et Weddell, 1971; Wilkie et Whittaker, 1997).

La cornée est richement innervée par des fibres nerveuses nociceptives. Ces fibres nerveuses proviennent du nerf ciliaire long qui prend origine de la branche ophtalmique du trijumeau (Mawas, 1951). Elles sont beaucoup plus nombreuses dans le tiers antérieur de la cornée et plus dispersées près de la membrane de Descemet (Mawas, 1951). Cette disposition rend les cellules épithéliales richement innervées très sensibles comparativement aux régions sous-jacentes et explique pourquoi les blessures superficielles sont souvent plus douloureuses que les atteintes profondes (Samuelson, 1999).

## 1.2 Processus de guérison de la cornée

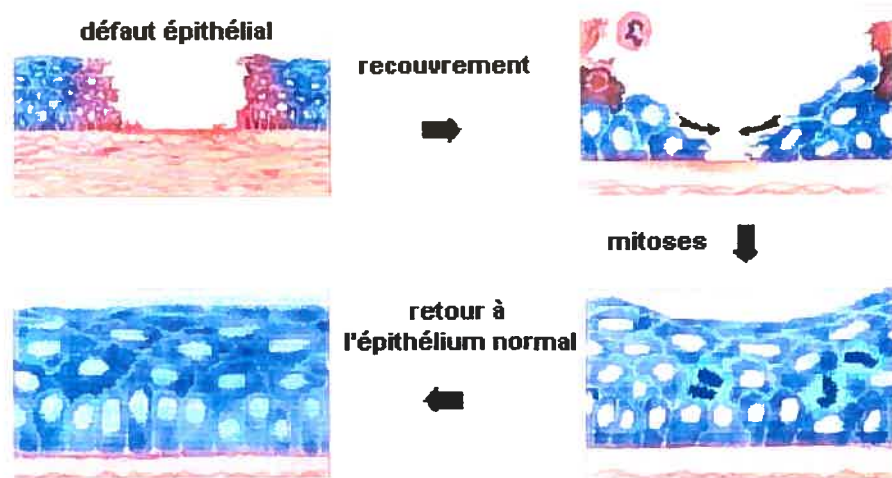
À la suite d'un traumatisme cornéen, des médiateurs sont libérés et stimulent la vascularisation conjonctivale adjacente. Cette dernière devient hyperhémique et révèle une perméabilité vasculaire accrue. Des neutrophiles peuvent ainsi migrer et atteindre l'épithélium ou le stroma cornéen par l'entremise du film de larmes. Les neutrophiles et les cellules épithéliales cornéennes endommagées sont d'importantes sources de cytokines angioblastiques et fibroblastiques (FGF, TGF- $\beta$ , PDGF, VEGF). Ces dernières sont responsables, selon la situation, d'orchestrer tout changement moléculaire et cellulaire subséquent (angiogénèse, mitose cellulaire, maturation et synthèse du collagène) (Peiffer et al., 1999).

On observe une néovascularisation cornéenne provenant du limbe et une transformation des kératocytes en fibroblastes de trois à quatre jours après le traumatisme. Cette transformation des kératocytes permet de produire une quantité importante de matrice extracellulaire. Plus la néovascularisation cornéenne prend du temps à se former plus les risques de cicatrice permanente sont grands.

Les cytokines sont aussi impliquées dans la guérison cornéenne. Elles assurent une continuité de l'épithélium cornéen sur toute sa surface et une adhérence adéquate de cet épithélium au stroma cornéen (Khodadoust et al., 1968). Tel que représenté à la figure 3, la continuité de l'épithélium à la suite d'un dommage de la cornée est d'abord assurée par la migration et l'étalement des cellules épithéliales qui entourent l'espace dénudé. Chaque cellule recouvre plusieurs fois sa surface initiale. Cette action est rapidement entreprise après un dommage, généralement au cours des heures qui suivent, et se maintient jusqu'à ce que tout l'espace atteint soit couvert. Une petite lésion cornéenne peut donc guérir rapidement sans multiplication cellulaire (Peiffer et al., 1999; Khodadoust et al., 1968; Wilkie et Whittaker, 1997). Par la suite, l'activité mitotique et l'exfoliation cellulaire

s'activent afin de reconstituer un nombre adéquat de cellules épithéliales pour assurer une épaisseur et une courbure cornéenne normale. Cette étape débute plusieurs heures et parfois même quelques jours après que le dommage soit survenu et peut durer plusieurs semaines. Les cellules inflammatoires accèdent au site via le film de larmes et facilitent la guérison en éliminant les débris (Wilkie et Whittaker, 1997; Nasisse, 1996).

Figure 3. Guérison d'une lésion épithéliale simple



Modifié à partir de Edgerton (1996)

Dans le meilleur des cas, l'adhérence avec le stroma se réalise deux à trois jours suivant l'épithélialisation (Borcherding et al., 1975). Toutefois, lorsque la cause du dommage persiste, une érosion chronique provoque l'épuisement de la capacité mitotique des cellules basales adjacentes à la lésion. Chez le chien, cette condition nécessite alors l'apport de cellules qui proviennent du limbe. Il se produit alors de la métaplasie squameuse avec kératinisation et pigmentation car les cellules provenant du limbe conservent leur pigmentation d'origine et donnent lieu à ce que l'on appelle une kératite pigmentaire. Si l'insulte est plus grave ou aigue, l'adaptation est plus difficile et on observe alors un ulcère cornéen (Peiffer et al., 1999).

À cause d'un métabolisme presque inactif et d'un processus de restructuration plus complexe, le stroma prend beaucoup plus de temps que l'épithélium pour guérir et nécessite parfois plusieurs mois (Peiffer et al., 1999; Wilkie et Whittaker, 1997). Lorsque le stroma est atteint, le site est d'abord rempli d'un bouchon de fibrine qui accueille rapidement les cellules inflammatoires provenant du film de larmes et du stroma adjascent. Ces dernières initient le processus de résorption des débris fibreux pour permettre aux kératocytes avoisinants et aux fibroblastes nouvellement formés de migrer au pourtour de la blessure et de produire le nouveau collagène (Nasissé, 1996).

La continuité épithéliale est assurée de la même façon lors d'une lésion profonde, impliquant le stroma ou lors d'une blessure superficielle, impliquant l'épithélium seulement. Néanmoins, l'ancrage de l'épithélium avec le stroma sous-jacent nouvellement formé prend plus de temps à se produire. Contrairement à ce qui se produit lors d'une lésion épithéliale superficielle, quand il y a lésion plus profonde, la membrane basale de l'épithélium est détruite. L'adhésion épithéliale peut ainsi prendre jusqu'à six semaines car une nouvelle membrane basale doit être formée pour assurer une adhésion efficace (Borcherding et al., 1975). Cette adhérence de l'épithélium est souvent précédée d'une croissance vasculaire. Par conséquent, pour assurer la transparence du stroma cornéen, toute activité angiogénique doit éventuellement régresser.

La composition initiale des glycosaminoglycans doit être rétablie le plus justement possible afin d'assurer un alignement optimal des fibres et par conséquent une transparence maximale (Peiffer et al., 1999; Nasissé, 1996). Cette réorganisation progressive des fibres de collagène peut se faire sur plusieurs mois (Fini, Cook et Mohan, 1998).

Les cellules endothéliales ne répondent pas aussi bien à une perte cellulaire. La perte de cellules endothéliales est comblée par l'étalement des cellules endothéliales adjacentes sans

multiplication cellulaire subséquente. Ce mécanisme engendre une réduction de la densité cellulaire endothéliale au cours de la vie qui peut éventuellement atteindre un niveau où la cornée décompense et n'arrive plus à maintenir un état d'hydratation relative adéquat (Peiffer et al., 1999; Nasissse, 1996).

### **1.3 Mécanisme de défense et immunité cornéenne**

La sensibilité cornéenne et le film de larmes sont les principaux moyens de défense non spécifiques de la cornée. Lorsque la surface cornéenne est stimulée, les paupières se ferment, le globe oculaire se rétracte, la nictitante fait prolapsus et la production lacrymale s'accroît. Tous ces mécanismes ont pour but de protéger la cornée et d'éliminer la source d'irritation. Lors de douleur extrême, ce réflexe est exagéré et produit un blépharospasme. Les paupières ont alors de la difficulté à ouvrir volontairement (Glenwood, Gelatt et Ofri, 1999).

L'efficacité de ce système de défense peut varier. Dans un premier temps, la sensibilité est différente d'un endroit à l'autre sur la cornée. Au centre, les fibres nerveuses sont non-myélinisées, alors qu'en périphérie, elles sont myélinisées (Glenwood, Gelatt et Ofri, 1999). La sensibilité cornéenne varie aussi d'un chien à l'autre selon la morphologie de la boîte crânienne. Celle-ci est moins importante chez les chiens brachycéphales comparativement aux chiens dolichocéphales (Barrett et al., 1991). Par conséquent, ce mécanisme de défense est moins efficace chez les brachycéphales et explique en partie pourquoi les kératites ulcérales d'exposition sont plus fréquentes chez les premiers.

Une stimulation douloureuse intense peut provoquer un réflexe axonal qui engendre un myosis, une hyperémie conjonctivale, une hypertension oculaire et une augmentation de la perte de protéines dans l'humeur aqueuse (Glenwood, Gelatt et Ofri, 1999). Il est donc courant de rencontrer ces signes lorsque la cornée est endommagée.



La cornée est dépourvue de vascularisation. Pour cette raison, la réponse immunitaire est discrète. Toutefois, les dommages cornéens et l'attraction subséquente des neutrophiles engendrent une néovascularisation et modifient ainsi, le statut immunitaire presque vierge de la cornée (Smolin et Friedlaender, 1995; Brooks, 1999). La réaction immunitaire de la cornée, implique les mêmes entités cellulaires et mécanismes immunitaires que ceux retrouvés dans les autres épithéliums de surface du reste du corps. Ainsi, nous retrouvons les lymphocytes B, les lymphocytes T *helper* et cytotoxiques, les macrophages et les anticorps. Une néovascularisation est souvent souhaitable pour obtenir une guérison cornéenne rapide (English, 1999).

Une cornée normale est pratiquement dépourvue de cellules immunitaires. Toutefois, des cellules dendritiques de Langerhans et des macrophages de la conjonctive empiètent dans la cornée périphérique (Scheiffarth et al., 1987; Vantrappen et al., 1985). De plus, la cornée est aussi, à l'état normal, dépourvue d'anticorps. Les anticorps présents, surtout des IgA, sont ceux qui résultent d'expositions antigéniques antérieures (Mondino et Pleyer, 1995).

En contre partie, la conjonctive et les glandes lacrymales sont immunologiquement très différentes de la cornée et très riches en cellules immunitaires. On retrouve au niveau des glandes lacrymales des lymphocytes B qui produisent, au besoin, une quantité importante d'anticorps (Franklin, McGee et Shepard, 1985; Franklin, 1989; Martin, Munnell et Kaswan, 1988). Ainsi, les larmes ont pour rôle lors de la réponse immunitaire spécifique, d'apporter les anticorps et les leucocytes à la surface oculaire (McGee et Franklin, 1984; Montgomery, Peppard et Skandera, 1990).

## **CHAPITRE 2: Le film lacrymal**

Chez tous les mammifères, le film de larmes, recouvre la cornée, la conjonctive bulbaire et la conjonctive palpébrale. Un changement qualitatif ou quantitatif de cette fine couche hautement organisée peut engendrer des pathologies cornéennes. Le film de larmes permet d'obtenir des renseignements sur la progression de certaines pathologies cornéennes et lacrymales grâce à la présence de cellules inflammatoires, d'enzymes cornéennes, de microorganismes, ou d'un déficit qualitatif du film de larmes.

Il sera donc question lors de ce second chapitre du film de larmes, de ses caractéristiques et des moyens employés pour l'étudier. Malheureusement, peu d'informations sont actuellement disponibles sur le film de larmes et sa composition chez les animaux. Par conséquent, plusieurs références à l'humain sont nécessaires.

### **2.1 Fonction générale**

Le film de larmes maintient les surfaces cornéenne et conjonctivale humides et réduit les frictions lors de mouvements oculaires et lors de la fermeture des paupières. De plus, il permet à la cornée de maintenir une surface régulière et uniforme (Records, 1995; Moore, 1999; Glenwood, Gelatt et Ofri, 1999).

Le film de larmes assure l'apport des éléments nécessaires à la santé cornéenne (oxygène, électrolytes) et le retrait de produits nuisibles à la cornée (particules étrangères, dioxyde de carbone, acide lactique) (Records, 1995).

La nature non kératinisée de la surface cornéenne et l'abondance de vaisseaux conjonctivaux font de ces surfaces une porte d'entrée idéale pour les agents infectieux. Il existe donc plusieurs composantes lacrymales (anticorps, lysozyme, lactoferrine, leucocytes) qui apportent une protection considérable pour ainsi permettre un contrôle de la flore bactérienne à la surface oculaire (Records, 1995).

## 2.2 Composition et structure

Il existe plus de 60 différents types de protéines dans le film de larmes : albumine, immunoglobulines, médiateurs inflammatoires, activateurs du plasminogène, protéases, lysozyme, lactoferrine, céruloplasmine (Records, 1995). Tous ces éléments contribuent à maintenir la tension de surface, à la régulation osmotique, au tamponnage du pH, au contrôle et à l'établissement des réactions inflammatoires.

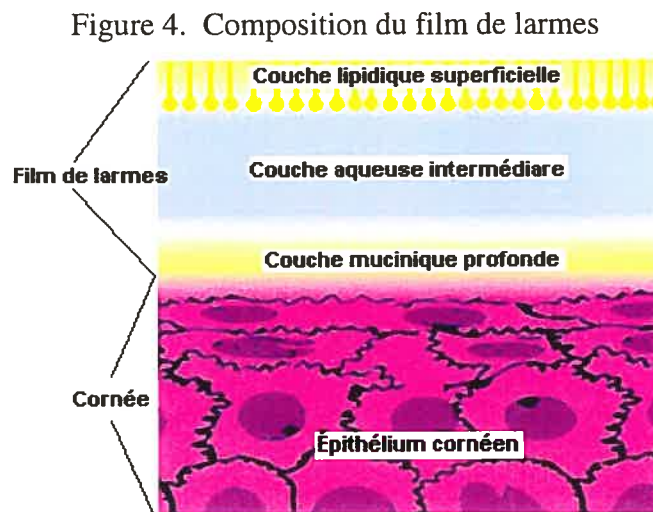
Selon l'origine, la concentration des protéines peut augmenter ou diminuer avec la production lacrymale (Fullard et Snyder, 1990). Par exemple, les lysozymes et la lactoferrine proviennent des glandes lacrymales. Par conséquent, leur proportion respective se maintient lors d'une augmentation de la sécrétion lacrymale (production réflexe). En contre partie, l'albumine qui provient des capillaires conjonctivaux se trouve diluée lors d'une production réflexe de larmes car elle ne provient pas des glandes lacrymales (Bjerrum et Prause, 1994; Ng et al., 2000). Dans le même ordre d'idée, certaines protéases libérées par les cellules cornéennes se trouveront diluées par une production réflexe de larmes. Ainsi, la production lacrymale peut modifier la valeur réelle de certaines protéines (Fullard et Snyder, 1990; Nakamura, Sotozono et Kinoshita, 1998).

Chez le chien, le niveau moyen de protéines totales est évalué à 3,5mg/ml avec 93% de globulines, 4% d'albumine et 3% de lysozymes (Roberts et Erickson, 1962). Les enzymes, telles les métalloprotéinases représentent ainsi une proportion théorique négligeable. Les processus inflammatoires entraînent une augmentation des protéines lacrymales.

On retrouve, aussi, dans le film de larmes, plusieurs cellules dérivées de la cornée et de la conjonctive. Chez l'humain, l'ordre d'importance des cellules retrouvées dans le film de larmes normal sont les lymphocytes, les cellules épithéliales et les polymorphonucléaires (Records, 1995). Lors d'une irritation locale ou de dommages cornéens, les proportions

cellulaires changent et les polymorphonucléaires prédominent pour quelques jours. Aucune étude spécifique aux chiens n'est rapportée à ce sujet.

Microscopiquement, le film de larmes est formé de trois couches qui interagissent pour lui procurer ses propriétés physiologiques (figure 4).



### 2.2.1 Couche lipidique

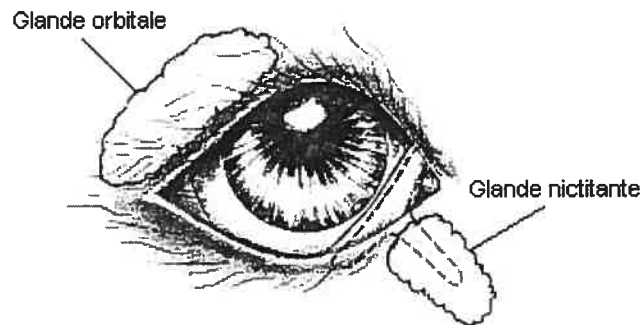
La première couche est une mince couche lipidique d'épaisseur variable ( $0,1\mu\text{m}$ ) composée de cholestérol estérifié et de lipides (Holly et Lemp, 1977; Glenwood, Gelatt et Ofri, 1999). Elle sert à prévenir l'évaporation hâtive et le débordement du film lacrymal sur les paupières. Elle est produite par les glandes de méibomius (Glenwood, Gelatt et Ofri, 1999) disposées sur les marges palpébrales. Cliniquement, cette portion peut être évaluée en mesurant le temps de rupture du film lacrymal (Cruzot-Garcher, 1999).

### 2.2.2 Couche aqueuse

La portion moyenne aqueuse, d'environ  $7\mu\text{m}$  d'épaisseur, représente 60% du film de larmes (Glenwood, Gelatt et Ofri, 1999). Principalement composée d'eau, elle possède plusieurs éléments en solution: sels inorganiques, glucose, urée, protéines, glycoprotéines,

oxygène, dioxyde de carbone, électrolytes, cellules en suspension (Holly et Lemp, 1977). Cette portion est très importante pour l'apport des nutriments et l'évacuation des déchets métaboliques (Moore, 1999). Chez le chien, la portion aqueuse est majoritairement produite par la glande orbitale et la glande nictitante (figure 5) (Moore, 1999; Glenwood, Gelatt et Ofri, 1999). La portion aqueuse peut cliniquement être évaluée par un test de Schirmer (Glenwood, Gelatt et Ofri, 1999).

Figure 5. Principales glandes lacrymales du chien



Modifié à partir de G. Constantinescu (Moore, 1999)

D'une espèce à l'autre, le pH est légèrement alcalin (7.5) mais la composition biochimique peut varier. Dans certain cas, la composition est étroitement reliée aux concentrations plasmatiques (Records, 1995). Chez l'humain, le bovin et le lapin la concentration des électrolytes est similaire à la concentration du plasma, sauf le potassium qui est de trois à six fois plus concentré que dans le plasma (Maidment, Kidder et Taylor, 1985; Mircheff, 1989).

### 2.2.3 Couche interne

La couche interne (0,02-0,05 $\mu$ m) est une couche de mucine (Glenwood, Gelatt et Ofri, 1999). Un apport constant de mucine, principalement produite par les cellules caliciformes de la conjonctive, doit être physiquement et chimiquement adéquat pour maintenir l'hydratation cornéenne et assurer la neutralisation et la séquestration de particules

étrangères. La mucine rend la cornée originalement très hydrophobique plus hydrophilique (Holly et Lemp, 1977). Tout comme la couche lipidique, la mucine contribue à la stabilité du film lacrymal (Glenwood, Gelatt et Ofri, 1999; Mishima, 1965). La qualité mucoïde du film de larmes peut donc être évaluée par le temps de rupture du film lacrymal. De plus, une imprégnation positive au rose de bengale des cellules épithéliales reflète aussi la mauvaise intégrité de cette portion mucoïde (Cruzot-Garcher, 1999).

## 2.3 Dynamique

Il existe quatre types de production lacrymale rapportés chez l'humain : psychogénique, réflexe (suite à une irritation, lumière, vent), continu (basal) et celui induit par des médicaments. Les animaux possèdent tous les types sauf le type psychogénique (Glenwood, Gelatt et Ofri, 1999). Le niveau basal est le niveau retrouvé sans aucune stimulation sur la surface oculaire. Il est possible de le mesurer cliniquement en effectuant un test de Schirmer suite à l'application d'un agent anesthésique (Schirmer type 2). Le niveau de production total (base + réflexe) s'évalue par un test de Schirmer sans anesthésie préalable de la cornée (Schirmer type 1). Le niveau basal représente environ 50% de la production totale de larmes chez le chien et le chat (Berger et King, 1998; Francois et Neetens, 1973).

La fermeture des paupières assure un étalement uniforme et un renouvellement constant du film de larmes sur la cornée. D'une espèce à l'autre, selon la surface cornéenne individuelle, le volume basal du film de larmes peut varier. Étant donné la grande variabilité de taille chez l'espèce canine, il est difficile d'obtenir un volume approximatif réel chez les différentes races. Chez l'humain ou le lapin, le volume lacrymal présent sur la cornée est approximativement de  $8\mu l$  alors que le volume retrouvé dans le cul-de-sac conjonctival inférieur de l'humain est de  $3\mu l$  (Mathis, 1999; Records, 1995). Le volume maximal pouvant être retenu sur la cornée est de  $20\mu l$ . Tout excès déborde sur la bordure

palpébrale et ne peut être retenu sur la surface cornéenne. De plus, chez l'humain le renouvellement lacrymal moyen dans un œil normal est de 16 % par minute donc une demi-vie du film de larmes de trois à six minutes (Mathis, 1999; Records, 1995; Mindel, 1995). Le clignement oculaire et une irritation peuvent augmenter la vitesse du renouvellement lacrymal en accélérant la vidange lacrymale dans le premier cas, et en augmentant la production lacrymale dans le deuxième. En effet, lors d'un clignement de paupière, le film de larmes s'accumule sur les marges palpébrales et est ensuite forcé de migrer médialement, vers les ouvertures lacrymales supérieures et inférieures pour être évacué par action capillaire via les canaux naso-lacrymaux (Glenwood, Gelatt et Ofri, 1999).

Par conséquent, l'application d'un agent ophtalmique peut induire un réflexe lacrymal, surtout s'il est irritant, et accélérer le changement lacrymal afin d'éliminer promptement l'agent irritant en cause. Pour les préparations ophtalmiques, il est donc préférable d'employer une solution isotonique (0,9% NaCl) afin de réduire l'irritabilité et ainsi, de favoriser un plus long contact et une meilleure pénétration cornéenne (Records, 1995; Holly et Lamberts, 1981).

## **2.4 Méthode de prélèvement et conservation des échantillons**

Il existe plusieurs façons de prélever un échantillon de larmes. Parmi les techniques décrites, notons l'utilisation d'un papier buvard tel qu'employé dans un test de Schirmer. Cette technique consiste à imbiber une languette de papier d'une quantité de larmes réflexes. Le tout peut ensuite être remis en solution et analysé. Cette technique a pour inconvénient d'altérer la valeur de certaines protéines lacrymales par la stimulation mécanique du papier buvard sur la conjonctive (Ng et al., 2000). L'irritation mécanique des vaisseaux conjonctivaux causerait une augmentation de la perméabilité vasculaire et une hausse des protéines dérivées du sérum comme l'albumine.

Une autre méthode favorise l'utilisation de micro-capillaires de verre. Cette technique est moins invasive et ne nécessite pas de contact avec la cornée ou la conjonctive. En théorie, les larmes obtenues sont donc de type basal. En pratique, il demeure toutefois très difficile d'éviter toute stimulation (lumière, courant d'air, manipulation périoculaire) et une portion de larmes réflexes est inévitable. Le principal inconvénient est le faible volume de larmes obtenu. Dans une étude, Geerling et al. (1999) ne démontre aucune différence significative entre l'activité enzymatique du film de larmes obtenu au moyen de micro-capillaire ou au moyen d'une éponge (similiaire au papier buvard).

Chez l'humain, différents moyens ont été utilisés pour stimuler la production lacrymale. La stimulation par le bâillement est un exemple (Ng et al., 2000). D'autres ont induit la production lacrymale par une stimulation de la muqueuse nasale ou encore en envoyant un jet d'air sur la cornée (Nakamura, Sotozono et Kinoshita, 1998; Pandit et al., 1999).

Enfin, une méthode alternative décrite pour la première fois en 1994 par Bjerrum et Prause consiste à appliquer une goutte de saline isotonique sur la cornée et de récolter le volume de larmes ainsi diluées. Afin de limiter les erreurs de manipulations, tel qu'un facteur de dilution variable, ou encore l'existence de délais différents entre l'application de la goutte et la récolte, cette méthode doit être standardisée en assurant la constance de ces éléments. L'effet inconnu de l'instillation de saline est un second inconvénient. Certains auteurs ont proposé que l'instillation de saline augmenterait la perméabilité des capillaires conjonctivaux et pourrait ainsi modifier le contenu de l'échantillon récolté (Ng et al., 2000). Dans cette même étude, les auteurs révèlent que la variabilité de la concentration protéique était plus grande dans les échantillons obtenus par irrigation cornéenne que dans ceux obtenus dans les échantillons récoltés par bâillement. Par conséquent, des précautions doivent être prises lorsque que l'on emploie cette méthode pour une évaluation quantitative des protéines du film de larmes.



Afin de préserver tous les constituants des larmes, les échantillons doivent être manipulés et entreposés adéquatement. Un effet direct de la température de conservation et de la durée d'entreposage sur la concentration des protéines dans les échantillons a été démontré (Sitaramamma, Shivaji et Rao, 1998). Selon la méthode de récolte utilisée, les échantillons ne peuvent pas être maintenus plus de quatre à huit heures à la température de la pièce sans un changement appréciable de la concentration des protéines totales. De plus, les protéines lacrymales sont beaucoup mieux préservées à  $-70^{\circ}\text{C}$  qu'à une température de  $-20^{\circ}\text{C}$  ou de  $4^{\circ}\text{C}$ , surtout sur une longue période. Aucun changement dans la composition protéique des échantillons conservés à  $-70^{\circ}\text{C}$  n'a été observé après quatre mois d'entreposage (Sitaramamma, Shivaji et Rao, 1998). De plus, il semble que les MMPs sont relativement stables à une température de  $-70^{\circ}\text{C}$  et que les échantillons peuvent être conservés un an sans observer une baisse d'activité (Bergman et Inzana, 2002). À  $4^{\circ}\text{C}$ , les échantillons peuvent être conservés jusqu'à sept jours sans perte significative de l'activité des MMPs. Toutefois, les cycles de gel et de dégel réduisent significativement l'activité des MMPs (Friedberg et al., 1998).

## **CHAPITRE 3: Métalloprotéinases**

### **3.1 Caractéristiques générales**

En 1962, Gross et Lapierre ont démontré, pour la première fois, la présence d'activité collagénolytique chez les amphibiens. Par la suite, une activité similaire s'est avérée présente dans plusieurs situations physiologiques et pathologiques (guérison de plaies, ovulation, arthrite, ulcération tissulaire et athérosclérose) (Gross, 1981; Werb, 1997; Woessner, 1998; Nagase et Woessner, 1999). Par leurs interactions avec la matrice extracellulaire et plusieurs cytokines, les métalloprotéinases (MMPs) sont des enzymes protéolytiques impliquées dans les mécanismes physiologiques et pathologiques de plusieurs organes incluant l'oeil (Sivak et Fini, 2002; Wong et al., 2002).

#### **3.1.1 Structure moléculaire et catégories des MMPs**

Les métalloprotéinases sont l'une des quatre classes d'endopeptidases divisées selon leur mécanisme catalytique fonctionnel. Les trois autres classes sont les protéases Aspartiques (Cathepsine D), les Cystéines (Cathepsine B) et les Sérines (Plasmine, TPA). Chaque classe se caractérise par un inhibiteur spécifique. Dans le cas des métalloprotéinases, ce sont les agents chélateurs comme l'EDTA qui remplissent ce rôle (Nagase et Okada, 1997). En effet, le calcium et le zinc sont indispensables à l'activité et au maintien de la structure des MMPs. Les agents chélateurs limitent ainsi la disponibilité des métaux environnants nécessaires aux MMPs et empêchent ces dernières de fonctionner normalement.

De plus, les MMPs se caractérisent par trois autres critères. D'abord, elles sont libérées sous forme latente et se présentent initialement sous la forme de proenzymes. Une activation ultérieure est nécessaire pour obtenir la forme active. Dans un deuxième temps, les MMPs contiennent un ion zinc qui est essentiel à l'activité catalytique de l'enzyme, d'où le nom de métalloprotéinases. Enfin, de façon endogène, elles sont inhibées et régulées par des inhibiteurs tissulaires des MMPs, couramment surnommés, selon l'abréviation anglophone, *TIMPs* (Sivak et Fini, 2002; Nagase et Okada, 1997).

En 2002, on comptait plus de 20 différents types de MMPs sur plusieurs organismes vivants (Sivak et Fini, 2002; Wong et al., 2002). Les différentes enzymes de cette classe sont identifiées selon un numéro (MMP-1, MMP-2, MMP-3, etc.) mais plusieurs utilisent régulièrement leur nom commun qui reflète davantage leurs propriétés historiques et fonctionnelles. Les MMPs sont généralement divisés en trois catégories principales telles que représentées dans le tableau #1 (Woessner, 1998; Nagase et Woessner, 1999).

Tableau # 1 Catégories principales des MMPs et leurs caractéristiques

Catégories	Origines	Rôles
<b>Collagénases</b> (Freije et al., 1994; Wong et al., 2002; Nagase et Okada, 1997)  MMP-1 MMP-8* MMP-13	cellules mésenchymateuses, les macrophages et les neutrophiles*	Dégradent les régions triples hélices des fibres de collagènes de type I-II et III et plusieurs composantes de la matrice extracellulaire.  Les fibres de collagène deviennent alors dénaturées.
<b>Stromelysines</b> (Nagase, 1995; Nagase et Okada, 1997)  MMP-3 MMP-10 MMP-11	cellules du tissu conjonctif et les macrophages	Digèrent plusieurs composantes de la matrice extracellulaire et le collagène de type III, IV, IX et X (Murphy et al., 1991).  Régulièrement impliquées dans l'activation de proenzymes.
<b>Gélatinases</b> (Nagase et Okada, 1997)  MMP-2 (gélatisase A) MMP-9 (gélatinase B)	MMP-2 est produite par une variété de cellules mésenchymateuses.  MMP-9 se retrouve dans les cellules mésenchymateuses, les macrophages, les neutrophiles et les leucocytes.	Les seules pouvant digérer les fibres de collagène dénaturées (gélatine) (Murphy et al., 1998).  Dégradation de la membrane basale, des protéines d'ancrage (la laminine et la fibronectine) et des fibres de collagène type III-IV-V-VII et XI.

\* MMP-8 est exclusivement produite par les neutrophiles, pour cette raison elle est aussi appelée collagénase neutrophilique.

### 3.1.2 Régulation enzymatique

Afin d'éviter une suractivité enzymatique, les enzymes protéolytiques sont précisément régulées de façon endogène. La concentration des MMPs peut être influencée à trois niveaux : à la transcription, à l'activation des proenzymes et enfin par la présence d'inhibiteurs enzymatiques tissulaires (Sivak et Fini, 2002; Wong et al., 2002).

La transcription est le niveau primaire de la régulation enzymatique. Comme bien des protéines, ces enzymes sont synthétisées lorsque la demande s'accroît. La transcription peut alors être inhibée ou encouragée par plusieurs cytokines et facteurs de croissance. Pour en nommer quelques uns, citons le *tumor necrosis factor* (TNF), l'interleukine-1 (IL-1) et le *transforming growth factor* (TGF) (Fini, Cook et Mohan, 1998). L'inhibition de l'IL-1 freinerait donc l'expression des MMPs (Solomon et al., 2000). La production des MMPs serait aussi influencée par des changements de morphologie cellulaire et par certains phénomènes chimiques et physiques telle l'irradiation (Sivak et Fini, 2002).

Dans un deuxième temps, la présence constante de MMPs, dans les tissus normaux est possible grâce au contrôle très rigoureux des méthodes de régulation post-transcriptionnelle (Yu et al., 1998). Au delà de la transcription, l'activation des proenzymes est régulée par différents inhibiteurs endogènes spécifiques et par l'interaction des formes latentes avec d'autres protéases environnantes (Nagase, 1997). Dans les conditions physiologiques, les inhibiteurs endogènes provenant du plasma et des tissus locaux assurent un renouvellement adéquat de la matrice extracellulaire; ils sont normalement plus nombreux que leurs protéases respectives.

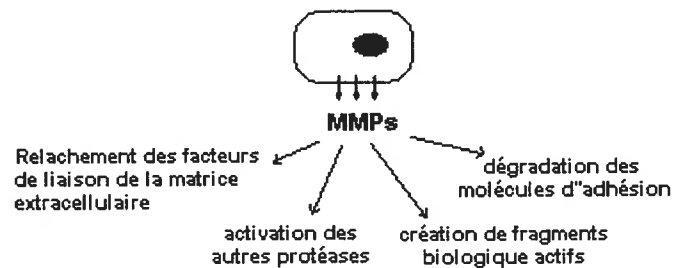
### 3.1.4 Rôles physiologiques et pathologiques généraux

Plusieurs propriétés découlent de la fonction primaire des MMPs qui consiste à la digestion de la matrice extracellulaire. Peu à peu, les études ont démontré le rôle des MMPs dans

plusieurs étapes indispensables à la guérison, soit : le remodelage de la membrane basale et de la matrice extracellulaire, la contraction de la plaie, le nettoyage des débris et la formation de néovascularisation et du tissu de granulation (Parks et al., 1998; Fini, 1999).

Les métalloprotéinases sont aussi un moyen employé par les cellules pour communiquer avec leur environnement (figure 6). Par exemple, les métalloprotéinases favorisent le relâchement de différentes cytokines et l'activation des autres protéases (les MT-MMPs activent les MMPs 2 et 9) (Vu et Werb, 2000). Ou encore, le clivage des points d'ancrage des cellules épithéliales avec leur membrane basale par les MMPs permet aux cellules d'initier leur migration et d'assurer l'intégrité de plusieurs surfaces (Sivak et Fini, 2002).

Figure 6. Illustration des rôles extracellulaires multiples des MMPs



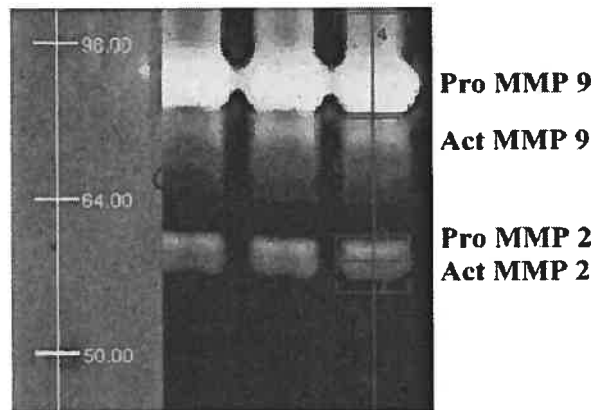
Modifié à partir de Sivak et Fini (2002).

### 3.2 Détection et analyse des métalloprotéinases

Il existe plusieurs techniques pour mettre en évidence l'activité enzymatique spécifique aux MMPs. La zymographie (Heussen et Dowdle, 1980) est la méthode la plus couramment utilisée dans la littérature (figure 7). Cette technique permet de séparer les enzymes protéolytiques selon leur poids moléculaire en utilisant l'électrophorèse et un gel de polyacrylamide copolymérisé avec un substrat spécifique pour les enzymes souhaitées. La position préalablement établie pour chaque enzyme, est alors déterminée par la dégradation subséquente du gel qui produit une bande claire sur un fond coloré au bleu de Coomassie.

Cette méthode est sensible et spécifique. Elle a pour principal avantage de connaître l'identité exacte de la protéine en question et le statut d'activité de cette dernière. La méthode est, par contre, longue et difficile à exécuter sur une large banque d'échantillons, car les manipulations techniques sont nombreuses et requièrent une bonne expertise.

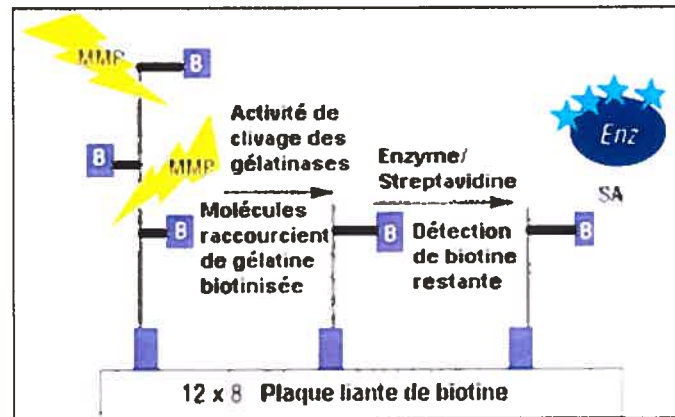
Figure 7. Illustration d'une zymographie



D'après Ollivier et al. (2003).

Bien que cette technique soit souvent privilégiée, il existe d'autres méthodes disponibles commercialement (figure 8). Dans le cas des gélatinases, on utilise comme substrat de la gélatine biotinisée. Une fois divisées par les enzymes protéolytiques, les fragments de gélatines biotinisés sont capturés au fond de chaque puit. Par la suite, ces mêmes fragments sont détectés par une streptavidine conjuguée à une peroxydase qui se lie à une autre molécule de biotine sur le fragment capturé. Ainsi, pour être détecté, un fragment digéré doit posséder au moins deux molécules de biotine. Pour cette raison, une forte activité gélatinolytique est associée à un faible signal émis par la streptavidine conjuguée, mesuré ultérieurement avec un spectrophotomètre à 450nm. Le degré de dégradation de la gélatine biotinisée est en forte relation linéaire avec la concentration des MMP-2 si cette concentration se situe entre 0,2 à 2,5 ng/ml (Ratnikov et al., 2000).

Figure 8. Illustration théorique de la détection des gélatinases par l'ensemble de détection commercial



Modifié à partir de Chemicon International; Gelatinase Activity Assay Kit

La sensibilité de cette méthode est comparable à celle de la zymographie et est capable de détecter une concentration de MMP-2 aussi faible que 0.16ng/ml (Ratnikov et al., 2000). Toutefois, des inhibiteurs spécifiques pour d'autres protéases (i.e aprotinine, leupeptine) doivent être ajoutés aux échantillons, afin de limiter les faux positifs et d'augmenter la spécificité du test, même s'il est connu que les métalloprotéinases sont responsables à 95% de l'activité protéolytique des kératocytes normaux (Smith et al., 1995).

Enfin, l'analyse concomitante des échantillons avec 10 mmol EDTA disodique permet d'inhiber toute activité gélatinolytique des MMP-2 et MMP-9 (ou de d'autre MMPs) et ainsi, de déterminer et d'éliminer la portion d'activité de dégradation, non associée aux gélatinases (Smith, Hoh et Easty, 1999; Ratnikov et al., 2000). Ce pseudo-ELISA a pour avantage d'être rapide et applicable pour un nombre élevé d'échantillons. De plus, cette technique permet de quantifier l'activité des gélatinases dans leur propre milieu, toujours sous l'influence des inhibiteurs endogènes.

## **CHAPITRE 4: Pathophysiologie des kératites ulcératives**

### **4.1 Kératite ulcérative simple**

Par définition, un ulcère est un défaut ou une excavation locale à la surface d'un organe d  à une perte de tissu nécrotique inflammé (Blood, 1998). Ce processus peut survenir sur plusieurs organes incluant la cornée. L'ulcère cornéen est l'une des causes principales de perte de vision chez le chien. La vision peut-être compromise par la cicatrice cornéenne résultante, ou à la suite de la perforation, par la formation de synéchies antérieures, d'endophtalmie, de collapsus de la chambre antérieure ou d'un glaucome secondaire. Il existe plusieurs étiologies possibles aux ulcères cornéens. Les plus fréquentes sont les traumatismes cornéens, un déficit de larmes, une mauvaise fonction ou un défaut de structure des paupières ou encore l'invasion d'un microorganisme (Nasisse, 1996).

#### **4.1.1 Symptomatologie**

La présentation clinique de la kératite ulcérative se caractérise par un blépharospasme aigu accompagné d'un épiphora. Si l'ulcère cornéen est présent depuis trois à quatre jours, de l'œdème cornéen localisé autour de la lésion et une congestion  pisc rale peuvent être notés (Wilkie et Whittaker, 1997). Dans le cas de lésions ulcératives chroniques, il est possible de retrouver de la néovascularisation cornéenne. Celle-ci fait partie du processus normal de guérison et chaque nouveau vaisseau croit normalement à raison de 1mm/jour à partir du limbe (Nasisse, 1996).

Tel que décrit dans le chapitre 1, lors de kératite ulcérative, une stimulation nerveuse de l'épithélium cornéen engendre un spasme ciliaire et un engorgement des vaisseaux de l'iris qui provoquent un myosis. Une hyperhémie conjonctivale et une perte de protéines dans l'humeur aqueuse peuvent aussi être notées (Wilkie et Whittaker, 1997; Nasisse, 1996).



### 4.1.2 Diagnostic

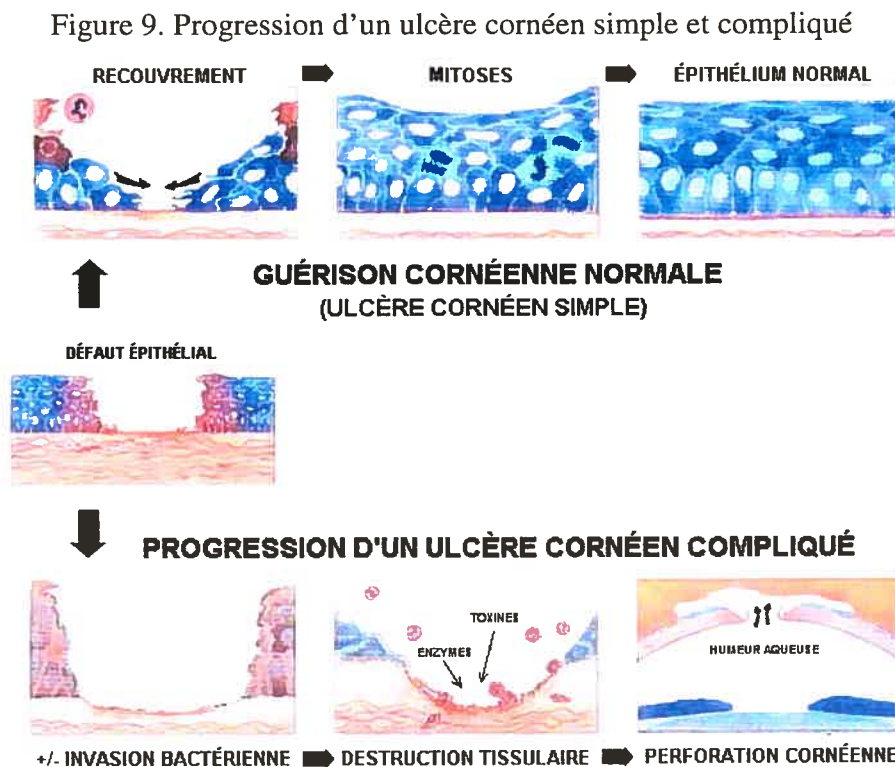
La coloration à la fluorescéine est le test qui permet de confirmer le diagnostic. Le caractère hydrophilique du stroma assure une coloration vert-pomme de la lésion ulcérate (Wilkie et Whittaker, 1997). Dans le cas d'une érosion cornéenne, où seul l'épithélium est atteint, le caractère hydrophobique de cette couche ne permet pas d'obtenir une coloration verte aussi nette (Nassise, 1996).

## 4.2 Kératites ulcérate compliquées

Lors de la guérison cornéenne, une augmentation contrôlée des protéases endogènes favorise l'élimination des cellules dévitalisées et des débris tout en encourageant la réépithélialisation et le remodelage tissulaire (Whitley et Gilger, 1999; Fini, Cook et Mohan, 1998; Ma et Dohlman, 2002). Toutefois, lors de kératite ulcérate compliquée, le mécanisme normal de rétrocontrôle physiologique enzymatique est affecté. On observe alors une augmentation non contrôlée des enzymes protéolytiques, comme les métalloprotéinases, à la surface cornéenne et dans le film de larmes (Sakimoto, Shoji et Sawa, 2003; Willeford et al., 1998; Smith et al., 2001). Il peut alors y avoir une dégradation excessive de la matrice extracellulaire cornéenne qui engendrera un ulcère compliqué. Dans un tel cas, si cette cascade enzymatique n'est pas freinée, une perforation de la cornée peut survenir en moins de 24 heures et mener à une perte complète et permanente de la fonction visuelle. Il est donc important d'être en mesure de réduire rapidement l'activité de ces enzymes pour favoriser la guérison.

Tel que représenté à la figure 9, la persistance de l'agression, par exemple lors de lagophtalmie, de kératoconjonctivite sèche ou de l'invasion de microorganismes comme *Pseudomonas*, empêche une guérison normale de se produire et favorise l'évolution vers un ulcère cornéen compliqué (Wilkie et Whittaker, 1997). Lorsque l'intégrité cornéenne assurée par l'épithélium cornéen n'est pas rapidement rétablie, les bactéries tels

*Pseudomonas*, *Streptococcus* et *Staphylococcus* peuvent adhérer et proliférer au site endommagé. Normalement, ces microorganismes adhèrent difficilement à la surface cornéenne intacte (Nasissé, 1996; Stern et Schultz, 1995). Sur une cornée « affaiblie », les microorganismes résistent plus aisément au nettoyage lacrymal et aux propriétés antimicrobiennes des larmes. Pour ce faire, les bactéries possèdent des particularités moléculaires à la surface membranaire, comme des fimbriae et des adhésines (Stern, Lubniewski et Allen, 1985). La virulence du microorganisme dépend, aussi, de sa capacité à causer une réponse inflammatoire et à activer ou produire des enzymes catalytiques.



Modifié à partir de Edgerton (1996)

Les bactéries les plus communément isolées lors de kératite bactérienne sont *Staphylococcus sp.* (39%), *Streptococcus sp.* (25%), *Pseudomonas sp.* (9,4%) *Escherichia coli* (4,7%), *Corynebacterium sp.* (3,9%) et *Bacillus cereus* (2,4%) (Gerding, McLaughlin et Troop, 1988; Gerding et Kakoma, 1990).

*Pseudomonas sp.* est particulièrement redouté pour la libération de ses protéases (Brown, Bloomfield et Tam, 1974; Kessler, Kennah et Brown, 1977) et sa capacité de migrer à l'intérieur de l'épithélium et du stroma cornéen afin d'éviter les mécanismes de défense naturelle de la cornée et les antibiotiques (Fleiszig, Zaidi et Pier, 1993). En lieu sur, celles-ci se répliquent et continuent à migrer (Hyndiuk, 1981) tout en libérant plusieurs protéases. Les enzymes libérées par les *Pseudomonas* peuvent aussi activer les gélatinases endogènes et favoriser l'ulcération cornéenne (Miyajima et al., 2001).

Néanmoins, avec ou sans infection, l'agression du stroma cornéen provoque rapidement un appel de polymorphonucléaires (PMNs) (Ma et Dohlman, 2002; Wilkie et Whittaker, 1997). Cette entrée massive de PMNs contribue à la production d'enzymes collagénolytiques (MMP-8). Les PMNs migrent dans le stroma cornéen et libèrent des collagénases qui amplifient les dommages déjà initiés par les protéases bactériennes. Cet étalement des dommages, du stroma à la membrane basale, engendre une réaction tissulaire et inflammatoire qui attire davantage les PMNs. L'augmentation exponentielle des PMNs est donc responsable de la majorité des dommages tissulaires (Stern et Schultz, 1995). Par conséquent, l'éradication du microorganisme et des protéases bactériennes impliquées est indispensable pour éviter une dégradation du stroma. Cependant, même si les antibiotiques et les leucocytes sont efficaces contre les microorganismes initialement responsables, le processus enzymatique de destruction peut se poursuivre. Enfin, soulignons que les cellules épithéliales et stromales lésées, contribuent aussi à la sécrétion d'enzymes collagénolytiques (Wilkie et Whittaker, 1997; Ma et Dohlman, 2002).

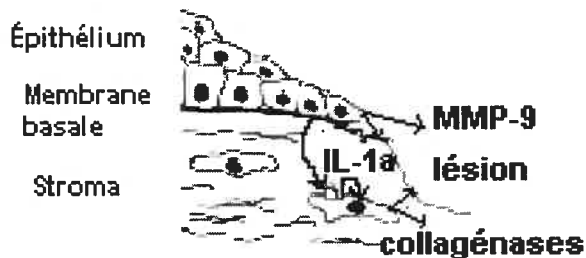
En résumé, les enzymes collagénolytiques et les autres protéases sont libérées par les bactéries, les cellules inflammatoires et les cellules cornéennes nécrosées. Elles engendrent un cercle vicieux et une destruction tissulaire (Whitley et Gilger, 1999). L'ulcère cornéen simple devient alors compliqué ou communément appelé « à la collagénase ».

## 4.2.1 Implication des enzymes et des cytokines

### 4.2.1.1 Généralité

Les différentes couches de la cornée interagissent entre elles de façon très coordonnée par l'entremise de cytokines, de facteurs de croissance, et d'enzymes protéolytiques. Ce système d'interactions paracrine et autocrine permet une réponse cellulaire appropriée lors d'un trauma cornéen. Tel qu'illustré à la figure 10, l'interleukine-1, issue des cellules épithéliales et des cellules inflammatoires, est particulièrement importante suite à un dommage tissulaire pour moduler la réponse cellulaire et la libération de MMPs (Ma et Dohlman, 2002; Fini, Cook et Mohan, 1998; Wilson et al., 1996). Ainsi, même si le rôle et l'interaction précise de chaque cytokine ne sont pas très bien connus, le déséquilibre de ces mécanismes peut mener à une ulcération cornéenne compliquée (Ma et Dohlman, 2002).

Figure 10. Exemple de l'interaction des cytokines et des enzymes



Modifié à partir de Sivak et Fini (2002).

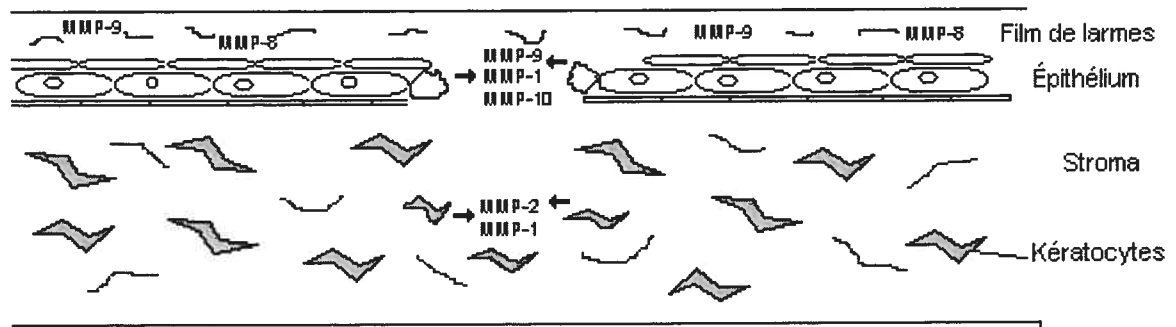
### 4.2.1.2 Présence physiologique des MMPs

Les métalloprotéinases (MMPs) 1-2-8 et 9 jouent des rôles primordiaux dans l'ulcération et la guérison cornéenne (Garrana et al., 1999; Ye et Azar, 1998). Toutefois, dans des circonstances physiologiques ces métalloprotéinases existent principalement sous forme inactive (Smith, Hoh et Easty, 1999; Smith et al., 2001; Sakimoto, Shoji et Sawa, 2003; Geerling et al., 1999).

Bien que les cellules cornéennes normales du lapin sont capables de produire les MMPs-2 et MMPs-9 (Fini et Girard, 1990), il existe une distinction préférentielle quant à l'origine cellulaire des deux enzymes. Les cellules cornéennes épithéliales synthétisent majoritairement la MMP-9, alors que la culture des cellules cornéennes du stroma synthétise davantage la MMP-2 (Fini et Girard, 1990).

En contrepartie, il existe certaines contradictions concernant l'expression de MMP-2 et 9 issues d'une cornée saine. Fini et al. (1990 et 1998) suggèrent que seul la MMP-2 peut-être identifiée *in situ* dans une cornée saine de lapin et de rat. Ceci l'amène à stipuler que la MMP-2 peut être activée rapidement en cas de besoin pour catalyser la dégradation de certaines fibres de collagènes endommagées. La MMP-2 aurait ainsi un rôle sentinelle et faciliterait l'épuration des débris cornéens. L'absence d'activité associée à MMP-9 en situation physiologique et l'augmentation considérable de cette même enzyme lors d'une lésion épithéliale, suggèrent un rôle de cette dernière dans l'évolution de la lésion cornéenne (Fini et Girard, 1990; Fini, Cook et Mohan, 1998). Or, il est intéressant de constater que plusieurs autres chercheurs ont pu identifier les proenzymes de MMP-2 et de MMP-9 comme composantes régulières du film de larmes provenant de sujets humains normaux (Sakimoto, Shoji et Sawa, 2003; Geerling et al., 1999; Smith et al., 2001; Kumagai et al., 2002). Dans certain cas, les proMMP-9 étaient même les plus abondantes (Sakimoto, Shoji et Sawa, 2003; Geerling et al., 1999). La figure 11 illustre l'origine et la distribution des MMPs dans le film de larmes lors de lésion cornéenne.

Figure 11. Origine et distribution des MMPs lors de lésion cornéenne



Modifié à partir de Wong et al. (2002).

Certains chercheurs ont quantifié la présence de MMPs 2 et 9 dans le film de larmes de la cornée humaine saine. Il est donc possible d'évaluer l'activité enzymatique des gélatinases qualitativement et quantitativement selon le volume d'échantillon (Leonardi et al., 2003) ou selon les protéines totales (Barro et al, 1998). Plusieurs études effectuées chez le cheval (Strubbe et al., 2000) et chez le chien (Willeford et al., 1998) ont aussi permis d'identifier respectivement une quantité basale de gélatinases et une activité protéolytique dans le film de larmes de sujets sains.

#### 4.2.1.3 Guérison cornéenne et implication des MMP-2 et MMP-9

La guérison cornéenne est grandement influencée par l'expression de MMPs. Un mécanisme impliquant les MMP-2 et les MMP-9 a été suggéré. Lors d'un dommage épithélial, MMP-9 est rapidement libérée et activée par les cellules épithéliales et les cellules inflammatoires. La présence de MMP-9 active devient donc maximale deux à trois jours après l'insulte épithéliale (Fini, Cook et Mohan, 1998; Fini, Girard et Matsubara, 1992; Matsubara, Zieske et Fini, 1991). Celle-ci permettrait la digestion des cellules nécrotiques et/ou de la membrane basale ainsi qu'un détachement des cellules épithéliales de la membrane basale dans le but de favoriser une réépithélialisation fonctionnelle rapide (Woodley et al., 1986; Fini, Cook et Mohan, 1998). Par la suite, dans les cas où une restructuration plus importante de la matrice extracellulaire est nécessaire, la stimulation

prolongée des kératocytes provoquerait la libération de MMP-2 et de d'autres collagénases (i.e. MMP-1) (Fini, Cook et Mohan, 1998; Matsubara, Zieske et Fini, 1991). Pour cette raison, une augmentation significative des MMPs-2 actives s'observe jusqu'à sept jours suivant la lésion initiale, au moment où la synthèse de la matrice extracellulaire et l'activité fibroblastique est à son maximum (Fini, Girard et Matsubara 1992; Matsubara, Zieske et Fini, 1991). La surexpression initiale de MMP-9 peut empêcher le rétablissement de la membrane basale et mener à l'ulcération cornéenne chronique avec implication des MMPs-2 et des autres collagénases.

Lors d'une kératite ulcérate compliquée par un processus de gélatinisation (*melting*), la dissolution du stroma cornéen est principalement le résultat d'une activité excessive des collagénases (Berman et al, 1988; Fini, Girard et Matsubara, 1992). Cependant, dans plusieurs modèles ulcératifs, la dissolution du stroma cornéen ne peut pas se produire avant que la membrane basale de l'épithélium cornéen soit disparue (Matsuda et Smelser, 1973). La dissolution de la membrane basale est donc cruciale pour la progression des kératites ulcéraives. La MMP-1 étant incapable de digérer les fibres de collagène que l'on retrouve dans la membrane basale, ce sont les gélatinases qui s'en occupent (Murphy et al., 1989). Pour cette raison, l'inhibition des gélatinase permet d'améliorer plus rapidement l'intégrité de la membrane basale et de limiter la progression de l'ulcère cornéen (Fini et al., 1996).

#### **4.2.1.4 Conséquences pathologiques**

La présence d'enzymes collagénolytiques dans le mécanisme d'ulcération cornéenne est bien établie (Slansky et al., 1969; Brown, Weller et Wassermann, 1969). L'implication des gélatinases et des protéases dans la progression des kératites ulcéraives et des autres pathologies oculaires est démontrée par plusieurs études effectuées chez le chien, le cheval, le lapin ou encore chez l'humain. Toutes ces études rapportent une augmentation significative de l'activité protéolytique dans le film de larmes cornéen correspondant aux cornées infectées ou ulcérées versus le film de larmes de cornées normales (Pineda-Bolivar

et al., 2001; Strubbe et al., 2000; Willeford et al., 1998; Smith, Hoh et Easty, 1999; Smith et al., 2001; Leonardi et al., 2003; Kumagai et al., 2002; Geerling et al., 1999).

### **4.3 Approche thérapeutique recommandée des kératites ulcératives compliquées**

Bien que le traitement de la kératite ulcérate simple se résume à l'usage topique d'un antibactérien et d'un parasympholytique, il n'existe pas de recette fixe pour tous les cas de kératites ulcératives compliquées où l'approche médicale doit être plus agressive. Les objectifs de guérison sont de permettre le rétablissement de la surface épithéliale, la néovascularisation cornéenne et la fibrose temporaire de la cornée tout en inhibant l'inflammation et l'activité enzymatique (Fini, Cook et Mohan, 1998). Par conséquent, l'approche thérapeutique inclut l'antibiothérapie, la neutralisation enzymatique, l'analgésie, la protection et parfois un tissu de reconstruction (Nasissé, 1996).

#### **4.3.1 Approche médicale**

##### **4.3.1.1 Antibiothérapie**

L'antibiothérapie topique et/ou sous-conjonctivale d'un agent bactéricide à large spectre est nécessaire. Dans certaines situations, une combinaison de deux ou trois voies d'administration est préférable, par exemple, dans les cas où une perforation et une endophthalmie sont suspectées. La fréquence d'application peut varier selon l'aspect clinique allant de quatre fois par jour à une administration toutes les heures. Toutefois, lors de gélatinisation cornéenne, l'antibiothérapie locale doit être agressive (toutes les heures) et présenter un spectre d'action incluant les bâtonnets à gram négatif comme le *Pseudomonas* (Nasissé, 1996). La tobramycine et le ciprofloxacine sont généralement adéquats (Hyndiuk et al., 1996). Une culture et une cytologie de la région ulcérée permettent de mieux cibler l'antibiothérapie.



#### 4.3.1.2 Inhibiteurs enzymatiques

La pathogénie moléculaire des kératites ulcératives compliquées et progressives, démontre le besoin de freiner la cascade enzymatique. Plusieurs études tentent de démontrer la pertinence d'inclure des inhibiteurs enzymatiques dans l'approche thérapeutique médicale des kératites ulcératives avec gélatinisation (Wentworth, Paterson et Gray, 1992; Schultz et al., 1992; Brown et Weller, 1970). Les brûlures chimiques alcalines représentent le meilleur exemple concret dans lequel on retrouve une suractivité des métalloprotéinases (Pfister, 1984, Brown, Weller et Wassermann, 1969). Ce modèle expérimental est souvent employé chez les animaux pour provoquer et étudier l'environnement retrouvé lors d'ulcère à la collagénase (Sakimoto, Shoji et Sawa, 2003; Schultz et al., 1992; Wentworth, Paterson et Gray, 1992). Plusieurs travaux suggèrent que l'application d'inhibiteurs de collagénases réduit l'incidence de kératites ulcératives induites expérimentalement par brûlures cornéennes chimiques et assure une meilleure réépithélialisation cornéenne (Brown, 1970; Schultz et al., 1992). Ces agents incluent l'EDTA, l'acétylcystéine, la pénicillamine et d'autres inhibiteurs synthétiques. Dans le même ordre d'idée, les travaux de Ollivier et al. (2003) ont démontré que l'utilisation *in vitro*, d'EDTA, de doxycycline, de N-acétylcystéine et de sérum a permis de réduire jusqu'à 99.4 % l'activité protéolytique associée aux MMPs dans le film de larmes de cornées ulcérées chez le cheval.

Certaines études proposent même l'inhibition des métalloprotéinases via l'inhibition de cytokines comme l'interleukine-1 par la doxycycline ou encore l'utilisation d'anticorps spécifiques contre les interleukines (Solomon et al., 2000; Li et al., 2001).

Lors de kératites ulcératives à *Pseudomonas*, l'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques synthétiques tel le galardin a aussi permis de réduire efficacement *in vitro*, l'activité enzymatique et de prévenir la destruction de la cornée de lapin infectée par cette bactérie (Barletta et al, 1996).

Bien que plusieurs agents semblent efficaces *in vitro*, leur efficacité *in vivo* n'est pas démontrée. À titre d'exemple, le travail de Campos et al. (2001) n'a pas permis de démontrer l'effet significatif de l'emploi d'autosérum ou d'acétylcystéine sur le processus de guérison de la cornée canine ayant expérimentalement subi une brûlure alcaline. Ces deux agents sont pourtant reconnus pour réduire l'activité enzymatique (Berman et Dohlman, 1975; Costa et Slatter, 1983; Haffner, Fecteau et Eiler, 2003; Ollivier et al., 2003; Slansky et al., 1970).

La variété d'inhibiteurs enzymatiques offre trois principaux modes d'action pour diminuer l'activité enzymatique. Dans un premier temps, les inhibiteurs peuvent agir directement sur l'enzyme en se fixant sur le site catalytique actif comme le font les inhibiteurs naturels, comme l' $\alpha_2$ -macroglobuline dont il sera question dans le chapitre 5. Dans un deuxième temps, ils peuvent influencer la composition environnementale en éliminant différentes composantes essentielles à l'activité catalytique comme le fait l'EDTA disodique en chélatant le calcium et le zinc (Weller et Brown, 1970; Brown et Weller, 1971). Enfin, certains agents peuvent agir sur la synthèse enzymatique comme par l'inhibition de l'interleukine-1.

Finalement, il est aussi possible de qualifier les inhibiteurs selon leur action réversible ou non. Par exemple, l'attachement direct de l' $\alpha_2$ -macroglobuline aux molécules enzymatiques en fait un inhibiteur irréversible contrairement aux agents influençant l'environnement mais n'ayant aucun effet direct sur l'enzyme. Ce dernier agent est alors réversible comme l'EDTA disodique. Ce concept devient important lorsqu'il s'agit de déterminer la fréquence d'application des inhibiteurs. En théorie, un inhibiteur réversible devra être appliqué plus fréquemment qu'un inhibiteur irréversible (Brown, Weller et Wassermann, 1969).

Le début de la thérapie par des inhibiteurs enzymatiques dans la progression de la lésion semble aussi influencer la réponse au traitement. En effet, plus la kératite ulcérate progresse, plus l'infiltration cellulaire de PMNs s'accroît et une plus grande diversité de protéases semble difficile à contenir (Wentworth, Paterson et Gray, 1992).

En conclusion, les inhibiteurs enzymatiques sont très prometteurs pour le traitement médical des ulcères cornéens compliqués. Même si l'efficacité actuelle des agents utilisés pour la neutralisation enzymatique est très controversée et bien souvent anecdotique, ces produits demeurent couramment utilisés et restent des moyens thérapeutiques indispensables à développer.

#### **4.3.1.3 Autres traitements**

Même si leurs propriétés anti-inflammatoires pourraient être intéressantes, l'usage de corticostéroïdes topiques est contre-indiqué lors de kératites ulcérate. En effet, ceux-ci retardent la guérison normale de la cornée en interférant avec l'épithélialisation, la migration leucocytaire, la formation de collagène et la néovascularisation cornéenne. De plus, ils suppriment le système immunitaire non spécifique (Havener, 1983; Martin, 1971) et potentialisent ainsi l'invasion bactérienne tel le *Pseudomonas sp* (Harbin, 1964). Malgré tout, certains rapportent un effet favorable des corticostéroïdes s'ils sont utilisés en association avec une antibiothérapie afin de ralentir l'activité enzymatique destructive et de limiter la cicatrisation cornéenne (Aronson et Moore, 1969). Toutefois, jusqu'à ce que d'autres études supportent davantage cette théorie, l'usage de corticostéroïdes locaux lors d'ulcères cornéens, est contre-indiqué (Nasissé, 1996).

## **CHAPITRE 5: Pharmacologie oculaire**

### **5.1 Voie d'administration pour le segment antérieur**

Les larmes, l'humeur aqueuse et les capillaires du limbe permettent à la cornée d'être en relation constante avec le reste du corps (Gaster et Leopold, 1992). Toutefois, certains agents thérapeutiques, en provenance du plasma, ont plus de difficulté à rejoindre les tissus oculaires. Pour cette raison, l'administration systémique d'un médicament, dans le but de traiter une pathologie du segment antérieur, doit se faire en combinaison avec une administration locale (Mathis, 1999).

L'application locale et l'injection sous-conjonctivale sont couramment utilisées. Cette dernière a pour avantage sur l'application locale d'apporter une concentration médicamenteuse plus efficace dans le segment postérieur de l'œil (Gaster et Leopold, 1992). Néanmoins, l'application locale est la voie d'administration la plus utilisée pour traiter les pathologies du segment antérieur en ophtalmologie vétérinaire (Mathis, 1999).

### **5.2 Dynamique : absorption, métabolisme et élimination**

Lorsqu'appliqué dans le cul de sac conjonctival, l'agent médicamenté est rapidement mélangé au film de larmes. La dynamique lacrymale peut donc influencer la pénétration médicamenteuse cornéenne (Mathis, 1999). Sur la cornée, les médicaments sont distribués dans la chambre antérieure, dans l'iris, dans le corps ciliaire et dans le cristallin. La cornée (Spiess et al., 1991) et le cristallin (Tang-Liu, Richman et Liu, 1992) peuvent accumuler et relâcher certaines molécules sur une plus longue période et d'agir comme « réservoir ». Très peu de molécules atteignent le segment postérieur via la cornée (Mathis, 1999; Lee et Robinson, 1986).

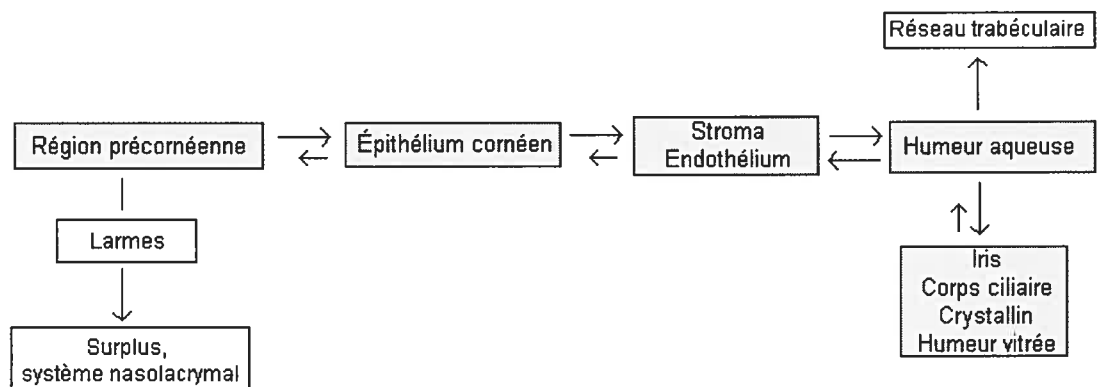
Certaines enzymes permettent de métaboliser les médicaments localement (Dubin et Trinquand, 2000). Toutefois, la majorité des produits sont peu modifiés et leur élimination

se fait principalement par la voie systémique après avoir franchi la barrière hémato-oculaire au niveau de l'uvée (Dubin et Trinquand, 2000; Mathis, 1999).

### 5.2.1 Facteurs influençant la pénétration oculaire

La cornée est une barrière physique où les médicaments pénètrent par diffusion simple. Aucun transport actif transcornéen n'a été identifié à ce jour. Le degré de diffusion est donc grandement influencé par la concentration de l'agent appliqué. Ce moyen de transport n'est pas saturable, ne peut être retardé par des inhibiteurs métaboliques et ne peut pas se réaliser contre un gradient chimique (Mindel, 1995). Pour agir efficacement, un médicament appliqué localement doit être absorbé rapidement pour éviter d'être éliminé de la surface cornéenne. La diffusion du médicament à travers l'épithélium est donc une étape cruciale pour l'absorption oculaire et sa distribution subséquente (figure 12) (Mindel, 1995).

Figure 12. Modèle de compartimentalisation de la pharmacocinétique lors de l'application oculaire topique



Modifié à partir de Mindel (1995).

Le caractère lipophile de l'épithélium et de l'endothélium empêche l'absorption de molécules polaires ou non liposolubles. En contrepartie, le caractère hydrophile du stroma rend l'absorption des molécules non polaires et liposolubles plus difficile. Il est donc avantageux de combiner une composante lipophile à un médicament hydrosoluble (Mathis, 1999; Lee et Robinson, 1986). Pour ces raisons, les suspensions ophtalmiques à base d'acétate ou d'alcool sont plus facilement absorbées via une cornée intacte que les solutions aqueuses de phosphate car elles ont une solubilité biphasique (Gaster et Leopold 1992).

Plusieurs facteurs réduisent la concentration de médicaments à la surface cornéenne (Havener, 1978). Parmi ces facteurs, notons le débordement d'un excédant du film de larmes, la dilution produite par les larmes présentes lors de l'application puis la dilution ultérieure causée par les larmes réflexes. Chez l'humain, la quantité maximale que l'oeil peut retenir est de  $10\mu l$  à  $20\mu l$  (Mindel, 1995; Gaster et Leopold, 1992; Mathis, 1999). Les comptes gouttes commerciaux libèrent habituellement un volume de  $50\mu l$ . Ainsi, seulement 20-40% du médicament déposé sur la cornée est disponible pour être absorbé. L'excédant déborde sur les marges palpébrales ou encore, est éliminé via le canal nasolacrimal. Cet excédant peut être absorbé par la muqueuse nasale ou celle du système digestif et entraîner des effets systémiques secondaires (Lee et Robinson, 1986; Burstein et Anderson, 1985). Ainsi, une goutte de petit volume, bien concentrée, est plus efficace qu'un grand volume de gouttes à plus faible concentration (Mindel, 1995). Étant donné un renouvellement constant moyen de 16% par minute du film de larmes chez l'humain, au bout de cinq minutes il ne reste que 42% du médicament initialement appliqué. Ainsi 42% de 20% signifie que moins de 8% du médicament administré est toujours présent cinq minutes après l'application. Cette quantité s'approche du 0% suite au larmoiement et clignement réflexe (Gaster et Leopold, 1992). Ceci explique pourquoi les cinq minutes d'intervalle entre l'application de différents médicaments sont importantes à respecter afin de limiter les interactions indésirables.

Certaines caractéristiques influencent aussi l'absorption des médications oculaires : la concentration, la viscosité, la solubilité lipidique, les agents additifs, le pH et la tonicité (Swan et White, 1942). Étant donné le mécanisme d'absorption, plus la concentration est importante, plus il y a de molécules absorbées dans une période de temps. Cependant le choix de concentration du produit est limité par le potentiel irritant de l'agent, le coût et la stabilité chimique (Mathis, 1999).

Certains agents additifs initialement utilisés comme agents de conservation (ex : benzalkonium) augmentent la pénétration oculaire en augmentant la perméabilité de la membrane cytoplasmique épithéliale. Ils peuvent ainsi être combinés à d'autres agents pour favoriser leur absorption (Gaster et Leopold, 1992). Malheureusement, même à de faibles concentrations, les agents additifs sont souvent irritants (Lee et Robinson, 1986). Par conséquent, ils accélèrent le drainage lacrymal et diminuent l'absorption cornéenne.

Le pH et la tonicité des agents ophtalmiques sont aussi importants pour déterminer la pénétration oculaire. Une formulation oculaire idéale devrait être tamponnée à un pH de 7,2 +/- 0,2 et posséder une osmolarité de 300mOsm, ce qui correspond approximativement à une solution de NaCl de 0,9% (Mathis, 1999). Un agent ophtalmique ne possédant pas ces paramètres physicochimiques peut s'avérer irritant pour l'oeil. Le pH influence aussi la biodisponibilité de certaines molécules en modifiant l'état liposoluble ou hydrosoluble de certains produits (ionisés vs non ionisés) (Lee et Robinson, 1986).

Le véhicule employé pour transporter les molécules médicamenteuses influence aussi le niveau de médicament absorbé par la cornée. Même si la croyance populaire est qu'une préparation en onguent favorise l'absorption du médicament en permettant un contact prolongé des molécules avec la cornée, les molécules médicamenteuses dans un onguent ne seraient pas aussi facilement disponibles pour la cornée comme elles le sont dans un collyre

ophtalmique (Gaster et Leopold, 1992; Leibowitz 1975). Le choix du véhicule approprié devrait davantage se faire selon la rapidité d'action, la saturation tissulaire ou encore la durée d'action recherchées.

Les protéines du film de larmes peuvent aussi interagir avec l'absorption des médicaments. Tout comme elles le font dans la circulation sanguine, les protéines lacrymales peuvent se lier au médicament et diminuer sa biodisponibilité (Mathis, 1999). Ainsi, lors de certaines pathologies oculaires telle une conjonctivite, le niveau de protéines lacrymales est augmenté et peut, par conséquent, influencer l'effet thérapeutique du médicament appliqué (Mindel, 1995).

Enfin, la condition oculaire au moment de l'application peut influencer la biodisponibilité des médicaments administrés sur l'oeil. Lors d'une inflammation oculaire, les barrières hémato-oculaires sont altérées. La pénétration intraoculaire en provenance des capillaires sanguins est donc favorisée. De plus, l'augmentation de la perméabilité lors d'œdème cornéen (Barza et Baum, 1992) ou le dénudement épithélial lors d'une kératite ulcéreuse peut favoriser la pénétration cornéenne surtout pour les agents non lipophiles (Cochereau, 2000).

### **5.3 Inhibiteurs enzymatiques étudiés**

Tout au long de cet ouvrage, la pertinence d'utiliser des inhibiteurs de métalloprotéinases dans certaines pathologies oculaires a été illustrée. Plusieurs mécanismes d'action ont été décrits dans la section 4.3.1.2. Voici maintenant des agents reconnus pour pouvoir inhiber les métalloprotéinases et qui seront utilisés dans cette étude.



### 5.3.1 EDTA

L'acide éthylènediamine tétra-acétique ou EDTA, est un puissant chélateur du calcium. Il s'avère particulièrement efficace pour lier le calcium environnant et le rendre non disponible aux métalloprotéinases (Brown, 1971). L'EDTA agit donc indirectement sur les enzymes. L'EDTA ne pénètre pas dans les cellules car, dans les milieux biologiques, il reste, même après chélation, des groupes R-COO<sup>-</sup> en excès, le rendant polaire et empêchant sa pénétration dans les cellules<sup>1</sup>.

*In vitro*, l'EDTA est parvenu à inhiber 99,3% de l'activité protéolytique associée aux métalloprotéinases dans le film de larmes de la cornée ulcérée chez le cheval. (Ollivier et al., 2003). Toutefois, malgré son excellente efficacité pour inhiber les métalloprotéinases *in vitro* et son indication pour traiter les ulcères cornéens associés à de la gélatinisation (Ward, 1999; Berman et Dohlman, 1975), son utilisation *in vivo* demeure mitigée car l'EDTA serait toxique pour les cellules de la cornée (Berman et Dohlman, 1975; Itoi et al., 1969; Corbett et al., 2001). Malgré tout, l'utilisation de 0,1% d'EDTA pour le traitement de la kératite ulcéreuse suite à une kératectomie effectuée chez le lapin n'a pas affecté la vitesse de réépithélialisation (Schultz, 1997). De plus, l'usage de concentrations se situant entre 0,05% et 0,2% pour le traitement d'ulcère de cornée chez le cheval semble être bien toléré (Brooks, 1999).

### 5.3.2 Cyclosporine A

La cyclosporine A est un puissant immunosuppresseur qui se lie au récepteur intracystoplasmique et inhibe la synthèse de lymphokines (i.e. IL-2 et IFN- $\gamma$ ) impliquées dans l'activation spécifique des lymphocytes T *helper* et B (Baumann, 1992; Mochizuki et De Smet, 1994). La cyclosporine A permet théoriquement de réduire le niveau des métalloprotéinases en réduisant la quantité de cellules et de cytokines inflammatoires.

Chez l'humain, l'immunosuppression systémique au moyen de la cyclosporine A a été employée avec succès pour traiter différents types d'ulcères cornéens gélatinisants (Kruit, 1988). De plus, l'application locale de cyclosporine A 2% a permis de prévenir le rejet de greffe cornéenne dans 98% des cas (Belin et al., 1989), complication pouvant être associée à un excès de gélatinases dans le film de larmes (Barro et al., 1998).

Combinée avec une médication traditionnelle, la cyclosporine A, a aussi permis de contrôler plusieurs types de kératites superficielles incluant les ulcères à la collagénase chez le cheval (Gratzek et al., 1995; Mathews, 1995).

La nature lipophile de la cyclosporine lui confère une excellente capacité de pénétration à travers la barrière épithéliale. Appliquée localement, la cyclosporine A atteint une concentration suffisante pour être mesurée dans les tissus oculaires superficiels (Gilger et Allen, 1998). L'augmentation de la fréquence d'application peut ainsi contribuer à augmenter la concentration à l'intérieure de la cornée (Regnier, 1999). Une étude chez les petits animaux confirme que l'application de cyclosporine A 2%, 4 fois par jour, permet une absorption suffisante pour contrôler des uvéites (Gregory et al., 1989).

Contrairement aux humains, où des effets secondaires indésirables telle une toxicité rénale, pouvant apparaître à la suite d'une ingestion systémique de 10mg/kg par jour, la cyclosporine s'est montrée très peu toxique pour le chat et le chien (Gilger et Allen, 1998). L'administration orale de 45mg/kg pendant 1 an, chez le chien, a entraîné, comme effet secondaire possible, le développement d'une hyperplasie gingivale, d'une gingivite non spécifique et d'une papillomatose cutanée sans aucune augmentation des paramètres biochimiques associés au rein ou au foie (Ryffel et al., 1983). Ainsi, même si les effets secondaires chez le chien et le chat sont possibles, ils demeurent peu inquiétants.

### 5.3.3 N-acétylcystéine

L'acétylcystéine est un agent mucolytique reconnu pour son activité anticollagénase chez plusieurs espèces (Berman et Dohlman, 1975; Costa et Slatter, 1983; Slansky et al., 1970). Malgré sa capacité de complexer les métaux, en clinique, elle est davantage utilisée pour son effet réducteur et comme donneur de cystéine, nécessaire à la synthèse du glutathion<sup>1</sup>.

Le mode d'action de l'acétylcystéine contre les protéases est partagé entre sa capacité de chélater le calcium environnant (Haffner, Fecteau et Eiler, 2003; Brown, 1971) et sa capacité de liaison avec l'ion  $Zn^{+}$  intrinsèque des MMPs (Berman et Dohlman, 1975; Slansky et al., 1970). Il aurait donc pour avantage d'agir directement sur l'enzyme active et sur l'environnement. Ces particularités permettraient à l'acétylcystéine d'agir comme inhibiteur irréversible en se liant directement sur l'ion zinc des collagénases (Brown, 1971). De plus, l'acétylcystéine pourrait aussi inhiber la transcription des MMPs pour ainsi ralentir leur synthèse (Galis et al., 1998).

Une étude (Haffner, Fecteau et Eiler, 2003;) effectuée sur des chevaux a permis de réduire significativement la digestion cornéenne *in vitro*, associée aux collagénases au moyen d'acétylcystéine 2%. Cette diminution de l'ordre de 50% était similaire à celle observée avec l'autosérum dans la même étude. Dans une seconde étude (Olliver 2003), toujours chez le cheval, l'acétylcystéine 10% a réduit 98,9% de l'activité protéolytique *in vitro* associée aux métalloprotéinases du film de larmes équin.

En clinique, l'application oculaire locale d'acétylcystéine avec une concentration de 20% n'a démontré aucune toxicité apparente (Jones et Coop, 1965) ou interférence avec le

---

<sup>1</sup> [http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Complexants\\_chelateursa3.php](http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Complexants_chelateursa3.php)

processus normal de guérison épithéliale (Petroustos et al., 1982; Campos et al., 2001). Toutefois une utilisation locale à plus de 5% a démontré un potentiel irritant pour la cornée (Thermes, Molon-Noblot et Grove 1991).

### 5.3.4 Doxycycline

La doxycycline, tétracycline de longue action de deuxième génération (Dursun et al., 2001), est un antibiotique bactériostatique à large spectre. Malgré la non disponibilité commerciale de cet agent en produit ophtalmique, il est possible de l'obtenir à partir du produit injectable et des larmes artificielles (Ward et Clark, 1991).

Il a été démontré que les tétracyclines inhibent l'activité des métalloprotéinases indépendamment de leurs propriétés antimicrobiennes (Golub et al., 1991). À titre d'exemple, l'usage de doxycycline a favorisé la guérison de plusieurs ulcères cornéens réfractaires au traitement conventionnel (Dursun et al., 2001). Les propriétés anti-inflammatoires de la doxycycline sont illustrées par Solomon et al. (2000) qui parviennent à réduire l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  produit par l'épithélium cornéen humain en utilisant la doxycycline. Ce mécanisme d'action pourrait expliquer la réduction de 70% de l'activité de MMP-9, obtenue *in vitro* par les cellules épithéliales cornéennes traitées avec de la doxycycline (Sobrin et al., 2000). Enfin, dans une autre étude (Ollivier et al., 2003), la doxycycline 1mg/ml a permis de réduire *in vitro* 96,2% de l'activité protéolytique des métalloprotéinases.

Le mécanisme d'action des tétracyclines et de la doxycycline envers l'activité protéolytique des MMPs n'est pas très clair. Outre son action anti-inflammatoire, les tétracyclines pourraient se lier aux ions zinc retrouvés dans les MMPs (Golub et al., 1991; Smith GN et al, 1999).

Chez l'humain, la doxycycline est utilisée avec succès pour traiter les érosions cornéennes associées à la rosacée, condition inflammatoire chronique où l'on retrouve une augmentation de l'activité enzymatique (Frucht-Pery et al., 1993). Chez les animaux, la tétracycline est couramment utilisée pour soigner différentes conditions ophtalmologiques (Whitley et Gilger, 1999), toutefois, très peu d'information est disponible quant à l'utilisation de la doxycycline en ophtalmologie canine.

### 5.3.5 Autosérum

En ophtalmologie vétérinaire et humaine, plusieurs travaux rapportent l'utilisation de l'autosérum dans diverses pathologies cornéennes (Tsubota et al., 1999; Campos et al., 2001; Poon et al., 2001; Whitley et Gilger, 1999). Plusieurs éléments du sérum qui favorisent la guérison épithéliale peuvent justifier la pertinence de cet usage (Poon et al., 2001). Les facteurs de croissance (EGF, FGF), la fibronectine et les antiprotéases en sont quelques exemples.

L' $\alpha_2$ -macroglobuline est un inhibiteur non spécifique très puissant des MMPs (Nagase et Okada, 1997). Synthétisée principalement par le foie, on la retrouve dans le sérum et plusieurs tissus dont la cornée (Nagase et Okada, 1997; Twining et al., 1994). Étant donné sa capacité d'inhiber un très large spectre de protéases, elle joue un rôle très important de protection contre les dommages effectués par les protéases endogènes et exogènes (Twining, 1994). L' $\alpha_2$ -macroglobuline est composée de quatre régions pouvant être clivées par les protéases. Le clivage de l'une de ses régions engendre un changement de conformation qui isole la protéase (Twining et al., 1994; Woessner, 1991). Le complexe ainsi formé est rapidement éliminé par les macrophages et les fibroblastes (Nagase et Okada, 1997). Cet inhibiteur agit donc directement sur les MMPs actives. De plus, l' $\alpha_2$ -macroglobuline a le pouvoir de lier plusieurs cytokines et autres facteurs de croissance les rendant ainsi non disponibles à la stimulation transcriptionnelle des MMPs (Nagase, 1997).

L'usage *in vitro* d'autosérum a permis de réduire 90% de l'activité des métalloprotéinases dans le film de larmes équin associée à un ulcère cornéen (Ollivier et al., 2003) et 50% de l'activité digestive associées aux collagénases chez le cheval (Haffner, Fecteau et Eiler, 2003). En contrepartie, Itoi et al. (1969) n'ont pas observé d'inhibition des collagénases épithéliales en utilisant de l'autosérum chez le lapin alors que Campos et al. (2001) n'ont pu établir un avantage sur la guérison de lésions cornéennes canines en utilisant de l'autosérum.

### **5.3.6 Glycosamynoglycans polysulfatés**

Les glycosamynoglycans polysulfatés sont couramment utilisés pour réduire les changements articulaires dégénératifs associés à l'ostéoarthrite du chien, du cheval et du lapin (Carreno, Muniz et Howell, 1986; Lust et al., 1992). Ils sont reconnus pour inhiber plusieurs enzymes cataboliques dont les lysosymes, les hyaluronidases, la plasmine et l'activateur de plasminogène (Burkhardt et Ghosh, 1987; Miller, 1996). De plus, au niveau articulaire, les glycosamynoglycans polysulfatés auraient pour effet de stimuler la synthèse des protéoglycans et des fibres de collagène par les fibroblastes et les chondrocytes (Burkhardt et Ghosh, 1987).

L'utilisation *in vivo* de glycosamynoglycans polysulfatés a permis de réduire l'activité protéolytique associée à un ulcère cornéen persistant et s'est avérée être un traitement efficace dans 83 % des cas d'ulcères cornéens persistants (Willeford et al., 1998; Miller, 1996). Lors de kératites ulcéraives, une augmentation de la concentration de plasmine est aussi notée (Salonen et al., 1987). Ainsi, l'efficacité des glycosamynoglycans polysulfatés serait davantage associée à sa capacité d'inhiber la plasmine qui est responsable de la dégradation des fibres d'ancrages permettant l'adhésion des cellules épithéliales au stroma cornéen. (Willeford et al., 1998).

### 5.3.7 Ciprofloxacine (Ciloxan®)

Membre de la famille des fluoroquinolones, le ciprofloxacine est un antibiotique bactéricide chélateur du magnésium<sup>2</sup> qui lui permet d'interférer avec la synthèse de l'ADN. C'est un antibiotique à large spectre efficace contre un grand nombre de bactéries à gram négatif, incluant *Pseudomonas sp* et quelques bactéries aérobies à gram positif. Son large spectre d'action, son excellente biodisponibilité et sa faible toxicité en font un médicament couramment utilisé pour le traitement d'infections oculaires chez l'humain (Regnier, 1999; Robert et Tassy, 2000). Toutefois de l'irritation et de l'inflammation peuvent être rapportées à la suite de l'instillation oculaire de ciprofloxacine<sup>3</sup>.

Le ciprofloxacine n'a aucune vertu antiprotéolytique rapportée. Il est toutefois fréquemment utilisé lors d'ulcère à la collagénases pour limiter l'implication fréquente des *Pseudomonas*. Pour cette raison, une meilleure connaissance de son effet sur les métalloprotéinases serait pertinente.

---

<sup>2</sup> [http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Complexants\\_chelateursa3.php](http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Complexants_chelateursa3.php)

<sup>3</sup> Compendium des produits et spécialités pharmaceutiques, 36<sup>ième</sup> ed. Association des pharmaciens du Canada 2001 : p.355-356.

## CHAPITRE 6: Méthodologie

### 6.1 Choix des sujets

Un groupe de huit chiens beagles (quatre femelles, quatre mâles) en santé âgés de 1 à 3 ans à été sélectionné aléatoirement dans la colonie de Beagles du complexe de bioévaluation de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. Les sujets n'avaient aucun antécédent de pathologie oculaire et étaient tous confirmés indemnes d'anomalie oculaire susceptible d'influencer la production lacrymale normale suite a un examen ophtalmologique complet (test de Shirmer, biomicroscopie, fluorescéine, tonométrie, ophtalmoscopie indirecte). La présence d'une seule pathologie oculaire ou palpébrale était suffisante pour exclure le sujet de l'étude. Les sujets correspondant aux critères d'inclusion ont été utilisé tout au long de l'étude et chaque chien était logé dans un parc individuel.

### 6.2 Design de l'étude

Une étude expérimentale à double insu a été effectuée en suivant un modèle de carré latin. Chaque sujet a été traité avec les traitements et les séquences représentées dans le tableau II.

Tableau II Liste des agents étudiés

Produit	Concentration	Fréquence	Commentaires
A. Larmes artificielles	-	1gt., aux 6 heures pour 48 heures, OU	<i>Hypotears®</i> <i>Contrôle</i>
B. Cyclosporine A	1%	1gt., aux 12 heures pour 48 heures, OU	Préparé dans <i>Tears Plus®</i>
C. N-acétylcystéine	10%	1gt., aux 6 heures pour 48 heures, OU	<i>Mucomyst®</i> préparé dans <i>Hypotears®</i>
D. Ciprofloxacine	0,03%	1gt., aux 6 heures pour 48 heures, OU	<i>Ciloxan®</i> tel quel
E. EDTA	1%	1gt., aux 6 heures pour 48 heures, OU	sel de disodique préparé dans <i>Hypotears®</i>



<b>F. Doxycycline</b>	0,001%	1gt., aux 6 heures pour 48 heures, OU	Préparé dans <i>Hypotears</i> ®
<b>G. Glycosaminoglycans polysulfatés</b>	5%	1gt., aux 6 heures pour 48 heures, OU	<i>Adéquan</i> canin 100mg/ml préparé 1:1 dans <i>Hypotears</i> ®
<b>H. Autosérum</b>	-	1gt., aux 6 heures pour 48 heures, OU	prélevé sur chaque chien

**Légende.** gt : goutte ; OU : bilatéral

Une période de retrait de cinq jours a été respectée entre chaque changement de traitement pour assurer une élimination pharmacologique adéquate. L'étude s'est déroulée sur une période de huit semaines (tableau III).

Tableau III Répartition des traitements sur 8 semaines

<i>Chien</i>	<i>Sem.1</i>	<i>Sem.2</i>	<i>Sem.3</i>	<i>Sem.4</i>	<i>Sem.5</i>	<i>Sem.6</i>	<i>Sem.7</i>	<i>Sem.8</i>
<b>1</b>	G	B	F	E	D	A	H	C
<b>2</b>	D	E	H	C	A	G	B	F
<b>3</b>	F	H	D	B	A	E	G	C
<b>4</b>	H	F	B	C	D	A	G	E
<b>5</b>	C	G	F	E	A	D	H	B
<b>6</b>	E	D	G	A	F	B	C	H
<b>7</b>	B	C	E	A	F	G	H	D
<b>8</b>	A	F	G	C	B	E	D	H

### 6.3 Récolte des échantillons

Les échantillons du film lacrymal ont été obtenus à partir des yeux de tous les sujets à quatre moments différents pour chaque traitement, tel qu'indiqué dans le tableau IV.

Tableau IV Séquences d'administration des traitements et des prélèvements

	-24h	0h	6h	12h	18h	24h	30h	36h	42h	48h	49h	54h
GAGPS	P	T	T	T	T	P/T	T	T	T	T	P	P
Ciprofloxacine	P	T	T	T	T	P/T	T	T	T	T	P	P
Doxycycline	P	T	T	T	T	P/T	T	T	T	T	P	P
Auto sérum	P	T	T	T	T	P/T	T	T	T	T	P	P
Acétylcystéine	P	T	T	T	T	P/T	T	T	T	T	P	P
EDTA	P	T	T	T	T	P/T	T	T	T	T	P	P
Larmes artificielles	P	T	T	T	T	P/T	T	T	T	T	P	P
Cyclosporine A	P	T		T		P/T		T		T	P	P

P : prélèvement de 80ul de larmes dans chaque oeil

T : traitement dans chaque oeil

GAGPS : glycosaminoglycans polysulfatés

Le temps 0 signifie le début du traitement

La récolte des échantillons a été faite d'après une méthode adaptée de celle décrite par Bjerrum et Prause en 1994. Suite à l'instillation de 25µl de saline stérile 0,9% sur la surface oculaire (fig. 13), les paupières ont été maintenues entre ouvertes et immobiles pour dix secondes afin de limiter une élimination rapide du surplus lacrymal (fig. 14). Le nouveau film de larmes ainsi « créé » a été récolté dans le cul de sac conjonctival inférieur du canthus latéral au moyen de pipettes micro capillaires en verre de 25µl (*Fisherbrand*®) tout en évitant de toucher la cornée et la conjonctive (fig. 15). Cette étape a été répétée

trois fois pour chaque œil en respectant cinq minutes entre chaque prélèvement. Au total un volume moyen de  $80\mu\text{l}$  a été obtenu pour chaque œil. Tous les échantillons étaient rapidement réfrigérés en attendant d'être centrifugés à 6000 r.p.m. pour dix minutes afin d'éliminer les composantes solides des échantillons. Le délai maximal entre la récolte et la centrifugation a été de trois heures et quinze minutes. Par la suite, les échantillons des yeux gauche et droit pour chaque chien et à chaque heure de prélèvement ont été regroupés à volume égal pour former un volume moyen total de  $160\mu\text{l}$  par chien par traitement et par moment de prélèvement. Ces échantillons étaient placés dans un tube PCR (*Ultident*®) et congelés à  $-70^{\circ}\text{C}$  dans l'attente d'analyses ultérieures.

Figures 13-14-15 (de gauche à droite). Technique employée pour récolter les échantillons



#### 6.4 Analyse de l'activité des gélatinases

Afin de déterminer la concentration lacrymale en protéines et d'en tenir compte lors des analyses statistiques, une mesure des protéines totales a été effectuée pour chaque échantillon à l'aide du *BCA Protein Assay Reagent* (*Pierce Biotechnology*, Rockford, IL. # 23225). Soixante-quinze microlitres ( $75\mu\text{l}$ ) de chaque échantillon ont ensuite été incubés avec de l'acétate p-aminophénylmercurique (APMA, *Sigma-Aldrich*, St-Louis, MO 63103. # A9563) et 75 autres microlitres ont été incubés sans APMA pour une période de quatre heures à  $37^{\circ}\text{C}$  afin d'obtenir l'activité basale des gélatinases ainsi que l'activité totale (activité de base + activité latente) présentes dans le film de larmes.

Les échantillons ont ensuite été analysés avec le *Gelatinase Activity Assay kit* (*Chemicon International, Inc. Temecula, CA 92590. # ECM700*) afin d'évaluer l'activité des gélatinases par une quantification de la dégradation d'un substrat biotinisé propre aux MMPs-2 et MMPs-9 à l'aide de la colorimétrie. Afin de limiter les faux positifs et d'augmenter la spécificité pour les gélatinases, lors de la dégradation du substrat biotinisé, des inhibiteurs spécifiques à d'autres endopeptidases capables de digérer la gélatine ont été ajoutés (aprotinine, pepstatine, leupeptide ; *Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne. #236624, #1017101, #253286*).

La dégradation spécifique du substrat biotinisé permet de colorer le substrat intact restant avec un complexe enzymatique-streptavidine. La coloration ainsi obtenue donne une densité optique lisible à 450nm. Plus la densité optique est élevée, moins le substrat biotinisé aura été digéré, et moins l'activité des gélatinases aura été importante. Par la suite, chaque densité optique obtenue a été comparée à un standard maximal connu de MMPs-2 (donc une très faible densité optique) afin de déterminer une valeur numérique de l'activité relative pour chaque échantillon.

Tous les échantillons ont été dédoublés pour être parallèlement analysés et inhibés avec de l'EDTA disodique (4 $\mu$ l de 10mM). Ceci a permis d'obtenir une densité optique des échantillons inhibés et de déterminer le bruit de fond associé à une fausse activité pour éventuellement augmenter la spécificité pour la détection des MMPs. Ce bruit de fond d'activité soustrait de l'activité relative de chaque échantillon non inhibé donne l'activité de base des gélatinases dans les cas non soumis à l'APMA et l'activité totale des gélatinases dans les échantillons préalablement activés avec l'APMA.

## **6.5 Analyses statistiques**

Étant donné que dans cette étude les différents échantillons ont été comparés selon leur volume, les protéines totales ont été considérées comme cofacteurs dans toutes les analyses statistiques. Le sexe de l'animal a aussi été introduit comme co-facteur afin de limiter son effet et d'équilibrer l'activité enzymatique de tous les sujets indépendamment de leur sexe.

En tenant compte de ces cofacteurs, une ANOVA à double mesure répétée a été effectuée pour comparer l'efficacité entre les différents traitements, et entre les périodes ainsi que pour mesurer l'interaction entre le temps et les traitements. Lorsqu'une variation significative de l'activité relative entre différent groupe était démontrée, une analyse post-hoc de Dunnet ou de Tuckey permettait de cibler plus précisément les groupes qui se distinguaient du contrôle. Dans tous les cas, un p inférieur à 0,05 était considéré statistiquement significatif.

## CHAPITRE 7: Résultats

Article accepté par *Veterinary Ophthalmology*<sup>#</sup>

---

<sup>#</sup> Erreurs qui seront corrigées lors de l'impression finale de l'article : Les lettres a,b,c,d et e du texte correspondent respectivement aux symboles \*, †, ‡, § et ¶ retrouvés dans *table 1* (p.59).

## Topical effect of various agents on gelatinase activity in the tear film of normal dogs

Simon Couture,\* Michèle Doucet,† Maxime Moreau\* and Michel Carrier\*

\*Département des Sciences Cliniques and †Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Québec, Canada. J2S 7C6

Address communications to:

Michel Carrier

Tel.: 450-773-8521 ext. 8248

Fax: 450-778-8110

### Abstract

**Objective** To evaluate the topical effect of various agents, currently used in the treatment of melting ulcers, on gelatinase activity present in the tear film of normal dogs.

**Animal studied** Eight normal adult beagles.

**Procedures** Each animal received the following agents: cyclosporine A 1%, N-acetylcysteine 10%, ciprofloxacin 0.3%, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 1%, doxycycline 0.001%, polysulfated glycosaminoglycans (PSGAG) 5%, autoserum, and artificial tears during a 48-h period following a Latin square design. Tear samples were collected with micro-capillary pipettes following a corneal surface irrigation of each eye with sterile saline on four different occasions. Basal and total gelatinase activities were evaluated by optical density after processing in a commercial gelatinase activity assay. From the optical density ratio, a semi-quantitative measure of gelatinase activity was obtained. Basal and total activities were measured in all samples.

**Results** The lowest total gelatinase activity, representing a percent decline in the enzyme activity although not significant, was observed 1 h after the last treatment in seven out of the eight ophthalmic agents; EDTA (68%), ciprofloxacin (76%), cyclosporine A (68%), doxycycline (47%), artificial tears (26%), PSGAG (25%), and N-acetylcysteine (20%). However, only the reduction observed with EDTA 6 h after the last treatment was significantly lower compared to the reduction observed with the artificial tears.

**Conclusion** This study indicated that only EDTA was able to significantly reduce the gelatinase activity in a persistent manner in the tear film of normal canine eyes. Further studies will be required to evaluate the effect of EDTA under ulcerative conditions and to more accurately ascertain the potential *in vivo* effect of the other agents.

**Key Words:** antiproteolytic, dogs, EDTA, gelatinase, tear film

### INTRODUCTION

In complicated ulcerative keratitis, the usual mechanism of physiological enzymatic feedback associated with corneal healing is affected. It is then possible to observe an uncontrolled increase in proteolytic enzymes, such as metalloproteinases (MMPs), at the corneal surface and in the tear film.<sup>1-8</sup> It is therefore important to quickly reduce the activity of these enzymes in order to accelerate the healing time and limit complications.

The MMPs are comprised of four enzymatic classes: collagenases, gelatinases, stromelysines, and membrane type (MT-MMPs).<sup>9,10</sup> Collagenases digest types I, II, and III collagen fibers; gelatinases damage denatured collagen fibers and many components of the basal membrane; stromelysines

are not specific and will activate many MMP classes and MT-MMPs are involved in a variety of pericellular activities. MMP-2 is mainly produced by corneal stroma keratocytes, whereas MMP-9 is produced by epithelial cells.<sup>11</sup> MMPs have been identified, primary in latent form, in normal tear film.<sup>1,5,6</sup> After activation, endogenous MMPs are inhibited by tissue inhibitor of MMPs (TIMPS).<sup>12,13</sup>

MMPs are essential for many biological homeostatic processes and are involved in tissue remodeling, healing, and destruction of many tissues including the cornea.<sup>13,14</sup> However, when the endogenous regulation is interrupted, many pathological conditions may occur such as the production of metastases, arthritis, and ulcerative keratitis.<sup>9,10,15</sup> Accordingly, many studies have demonstrated a significant increase in the activity of gelatinases, MMP-2, and MMP-9 in the

tear film of humans, dogs, and horses with ulcerated keratitis in comparison with the activity that was observed in the tear film of healthy cornea.<sup>4,16-18</sup> Other studies have confirmed the importance of gelatinases in the pathogenesis of ulcerative keratitis.<sup>19,20</sup>

Metal-chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) are particularly effective in inhibiting MMPs, because calcium and zinc are essential for the activity and structural preservation of these enzymes.<sup>12</sup> Metal-chelating agents restrict the availability of surrounding metals necessary preventing MMPs's normal function.

Doxycycline,<sup>21-24</sup> EDTA,<sup>23,25</sup> N-acetylcysteine,<sup>23,26,27</sup> and autoserum<sup>23,26,28,29</sup> have all shown potential for inhibiting enzyme activity of gelatinases in an *in vitro* manner. Polysulfated glycosaminoglycans<sup>8,30</sup> (PSGAG) and cyclosporine A,<sup>31-33</sup> used *in vivo*, have contributed to healing of keratitis of dogs and humans without a known effect on MMPs.

Although these agents are commonly used clinically to neutralize the enzyme imbalance occurring with ulcerative keratitis, their effectiveness is currently much debated and only a few studies have succeeded in showing their *in vitro* effect. This study aims to determine whether the inhibition reported for these agents *in vitro* remains similar when they are used *in vivo*, on healthy dogs with physiological gelatinase enzyme activity. Then, according to most *in vitro* findings, we predict that the gelatinase activity should be lower in all treatment groups when compared to the control group.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

A group of eight healthy beagle dogs (four female, four male), aged from 1 to 3 years, were selected from a colony of beagles of the Complexe de Bioévaluation, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal. The subjects had no history of ocular pathology and a complete ophthalmologic examination (Schirmer test, biomicroscopy, fluorescein test, tonometry, indirect ophthalmoscopy) confirmed that they had no ocular abnormality that could influence normal lacrimal production. A single ocular pathology was sufficient to exclude a subject from the study. All subjects were used throughout the study and each dog was housed in separate run. The protocol had previously been approved by the Comité d'Éthique de l'Utilisation des Animaux, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal.

### Study design

A double blind experimental study was carried out following a Latin square design. Each respective subject was treated with the following single agents at 5 days intervals: artificial tears (Hypotears<sup>®</sup>, CIBA Vision Canada Inc. Mississauga, Ontario); polysulfated glycosaminoglycans 5% (Adéquan<sup>®</sup> canine, Luitpold Pharmaceuticals Inc., NY, USA, 100 mg/mL mixed 1:1 with Hypotears<sup>®</sup>), ciprofloxacin 0.3% (Ciloxan<sup>®</sup> Alcon Canada Inc. Mississauga, Ontario), EDTA 1% (disodium EDTA, Laboratoire Denis Giroux Inc.,

St-Hyacinthe, Quebec), doxycycline 0.001% (doxyxyclyne chlorhydrate, Laboratoire Denis Giroux Inc., St-Hyacinthe, Quebec), cyclosporine A 1% (Sandimmune<sup>®</sup> IV, Novartis Pharma Canada Inc. Dorval, Québec, mixed with Tears Plus<sup>®</sup>; Allergan Inc. Markham, Ontario), and acetylcysteine 10% (Mucomyst<sup>®</sup>, Shire Canada, Oakville, Ontario in Hypotears<sup>®</sup>). All ocular preparations were produced in the same artificial tears that were used for the control (Hypotears<sup>®</sup>, CIBA Vision Canada Inc. Mississauga, Ontario) except the cyclosporine because of pharmacist laboratory constraints and technical oversight. Ciprofloxacin and self-serum were administered without artificial tear additive. Self-serum was obtained from a blood sample that was taken from the jugular vein of each dog and prepared at the beginning of every week, then kept at 4 °C.

Each product was administered four times a day, for a 48 h-period in both eyes, except for cyclosporine A, which was administered twice a day in order to follow the recommended clinical protocol. A 5-day withdrawal period was observed between each treatment change in order to ensure appropriate clearance of each therapeutic agent. The study was conducted over a period of 8 weeks.

### Sampling

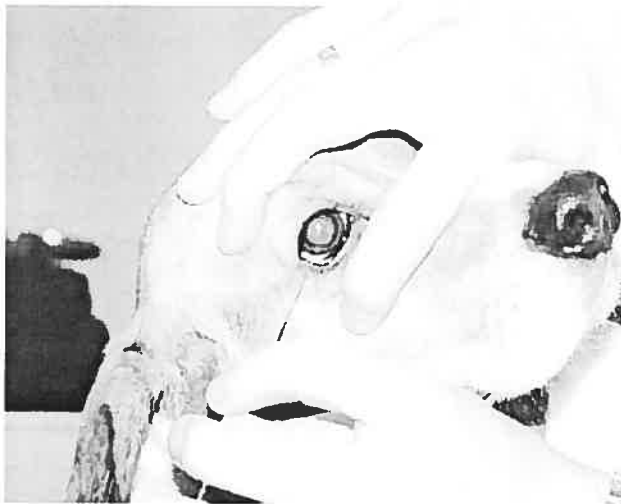
Tear samples were obtained from the eyes of all subjects at four different times for each treatment; 24 h before the first treatment (-24 h), 24 h after the first treatment (24 h), 1 h (49 h) and 6 h after the last treatment (54 h). Sampling was performed according to a method adapted from Bjerrum and Prause.<sup>34</sup> Following the instillation of 25 µL of 0.9% sterile saline on the ocular surface, eyelids were held half-open and immobilized for 10 s (Fig. 1). The tear film was then collected in the lower fornix of the lateral canthus using 25 µL capillary tubes (Fisherbrand Disposable Microcapillary Pipets 25 µL, Nepean, Ontario) while avoiding touching the cornea and the conjunctiva. This step was repeated three times for each eye while observing a 5-min delay between each collection such that a total volume of 80 µL was obtained for each eye. In order to familiarize the animals with this technique of collection, that procedure was performed a few times prior to the study. All samples were quickly refrigerated before being centrifuged at 6000 r.p.m. for 10 min in order to eliminate the sample's solid components. The maximal elapsed time period between sampling and centrifugation was 3 h and 15 min. Subsequently, left and right eye samples for each dog and at each sampling time were grouped together in equal volumes in order to obtain a total volume of 160 µL per dog, per treatment, and per sampling time. Samples were then placed in a polymerase chain reaction (PCR) tube (PCR tube, Ultident Scientific, St-Laurent, Quebec) and frozen at -70 °C until assay.

### Analysis of gelatinase activity

The BCA protein assay reagent (Pierce Biotechnology, Rockford, IL. #23225) was used to measure the lacrimal total protein concentration for use in statistical analyses.



Color image



**Figure 1.** Tear samples were collected with 25  $\mu$ L capillary tubes following a corneal surface irrigation of each eye with sterile saline from the lateral canthus, avoiding touching and traumatizing corneal and conjunctiva epithelium.

Aminophenylmercuric acetate (APMA, Sigma-Aldrich, MO, USA 63103. #A9563) was used as a latent MMP activator. Seventy-five microliters of each sample was incubated with APMA during a 4-h period at 37 °C in order to obtain basal gelatinase activity as well as total activity (basal activity + latent activity) present in the tear film, whereas another 75  $\mu$ L were incubated in the same conditions but without APMA in order to obtain only basal gelatinase activity.

From this point, all samples were duplicated to be analyzed with EDTA disodium (4  $\mu$ L of 10 mM) (EDTA disodium, Arthrolab, CHUM-Pavillon Notre-Dame Montréal, Québec) and without EDTA. This step was necessary to produce a 'false' enzyme activity, corresponding to a false background activity in inhibited samples. This background activity was subtracted from each noninhibited corresponding sample's activity in order to increase the specificity for gelatinase detection. Having subtracted this background activity, gelatinase basal activity was obtained in the cases that were not subject to APMA, and total gelatinase activity in samples that were previously activated with APMA.

All samples were analyzed using the gelatinase activity assay kit (Chemicon International, Inc. CA, USA 92590. #ECM700) according to manufacturer recommendations. Gelatinase activity was evaluated by using a colorimetric quantification of the degradation of a biotinylated gelatinase substrate, which is cleaved by active MMP-2 and MMP-9 (gelatinase) enzymes. Remaining biotinylated fragments were then added to a biotin-binding 96-well plate and detected with streptavidin-enzyme complex. The addition of this enzyme couplet results in a colored substrate, detectable by its optical density at 450 nm (OD<sub>450</sub>), which corresponds to the gelatinase activity (OD units). Then, data were com-

pared with standard MMP activity (positive control) and expressed as relative activity (calculated as percentage of control: [positive control OD/sample OD]  $\times$  100). Negative control optical density was obtained by using 0.9% sterile saline instead of tears.

Inhibitors specific to other endopeptidases capable of digesting gelatin were added (aprotinine, pepstatine, leupeptide) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, #236624, #1017101, #253286) in order to minimize false-positive results and increase the specificity for gelatinase during the biotinylated substrate degradation.

#### *Statistical analysis*

Given that different samples were compared according to their respective volume, total protein concentration was included as a cofactor in all statistical analyses. The sex of the animal was also included as a cofactor. Taking these cofactors into account, a repeated measures analysis with two crossover factors was carried out to compare the effect of treatment, the effect of time, and the interaction between time and treatment. When a significant variation in relative activity occurred among groups, Dunnett's posthoc tests allowed the groups that stood out from the control group to be more precisely targeted. A *P* value less than 0.05 was considered to be statistically significant.

#### RESULTS

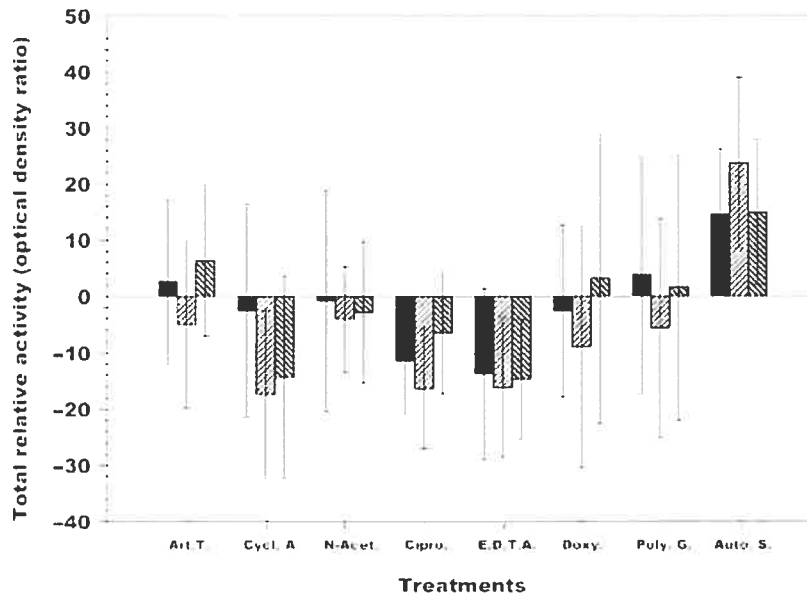
Mean collection time for a complete animal tear sample was 28 min ranging from 22 to 36 min. The minimal optical density value obtained from positive control was 0.037 and the maximal optical density value obtained from the negative control was 1.234. All optical densities obtained in our study samples were included between 0.063 and 1.064. Mean basal gelatinase relative activity was 5.24 (range 1–34.14) and the mean total gelatinase relative activity was 18.41 (range 0.84–65.38) for all samples combined. A linear model, with the individual treated as a random factor, showed a significant and positive relationship between basal and total gelatinase activities (*P* < 0.0001). Mean basal and total gelatinase activity for each treatment group at each time point is presented in Table 1.

#### *Mean basal activity*

There was a significant treatment effect (*P* = 0.0011), no significant effect of time, and no interaction between time and treatment for mean basal activity. At each time point, dogs receiving PSGAG had an increased basal activity compared to the artificial tears control (*P* = 0.0012)<sup>a</sup>. Sex (*P* = 0.036) and total protein concentration (*P* = 0.014) had a significant effect. Basal activity was higher in male dogs and increased with total protein concentration. To normalize each sample and limit errors, these two elements were considered as cofactors in all subsequent analyses. When the analyses were repeated without the PSGAG group, no significant treatment effect could be observed (*P* = 0.84).

**Table 1.** Means and standard deviations for basal and total gelatinase relative activity for each treatment group at different time points. art.t., artificial tears and control; cyclo., cyclosporine A; N-acet, N-acetylcysteine; cipro, ciprofloxacin; doxy, doxycycline; poly.g., polysulfated glycosaminoglycans; auto.s., autoserum

Treatments	Mean basal activity				Mean total activity			
	Baseline	24 h	49 h	54 h	Baseline¶	24 h	49 h¶	54 h
Art.t.*	3.63 ± 2.68	5.24 ± 5.51	2.84 ± 2.23	3.54 ± 2.09	18.73 ± 13.25	21.38 ± 18.95†	13.73 ± 19.31‡	25.09 ± 19.59§
Cyclo. A	4.95 ± 4.82	3.79 ± 3.19	2.17 ± 2.10	2.58 ± 3.14	25.73 ± 18.59	23.17 ± 14.97	8.31 ± 5.73	11.34 ± 10.78
N-Acet.	7.79 ± 10.00	6.13 ± 9.67	2.52 ± 1.68	4.27 ± 3.24	20.76 ± 17.77	19.92 ± 18.19	16.69 ± 12.85	17.91 ± 12.51
Cipro.	6.76 ± 6.50	3.91 ± 5.50	4.72 ± 4.96	5.53 ± 4.26	21.52 ± 11.77	10.03 ± 6.14	5.15 ± 8.05	14.97 ± 13.63
E.D.T.A.	6.61 ± 10.93	3.80 ± 3.96	2.43 ± 1.54	3.14 ± 3.44	23.97 ± 16.79	10.16 ± 15.65†	7.78 ± 7.64	9.29 ± 10.26§
Doxy.	5.22 ± 5.07	4.29 ± 3.44	4.16 ± 3.20	6.19 ± 5.88	18.78 ± 20.44	16.17 ± 9.73	9.88 ± 7.08	21.98 ± 15.12
Poly.g.*	11.39 ± 9.05	10.84 ± 5.14	10.50 ± 5.74	12.27 ± 10.55	22.19 ± 18.63	26.06 ± 11.63	16.59 ± 7.87	23.83 ± 17.77
Auto.S.	2.79 ± 2.57	3.08 ± 2.69	6.41 ± 7.95	4.12 ± 5.34	13.77 ± 8.76	28.45 ± 12.16	37.58 ± 11.60‡	28.71 ± 9.88



**Figure 2.** Graph representing mean change and standard deviation of total gelatinase activity vs. baseline. Ethylenediaminetetraacetic acid was the most potent agent to reduce the gelatinase activity in a long-lasting manner. Legend: black, after 24 h of treatment; left-oriented diagonal, 1 h after 48 h of treatment; right-oriented diagonal, 6 h after 48 h of treatment.

### Mean total gelatinase

Mean total gelatinase activity over time is shown in Table 1, whereas mean change in total gelatinase activity vs. baseline is shown in Fig. 2. There was a significant treatment effect ( $P = 0.0005$ ) and a significant interaction between time and treatment ( $P < 0.0001$ ) but no significant time effect ( $P = 0.12$ ) for mean total gelatinase activity. Sex and total protein concentration showed no significant effect ( $P = 0.73$  and  $P = 0.17$ , respectively). However, these two elements were still considered as cofactors in our analysis given the previous correlation. When the total relative gelatinase activity of each group including all time points were compared to the control group, the activity was similar.

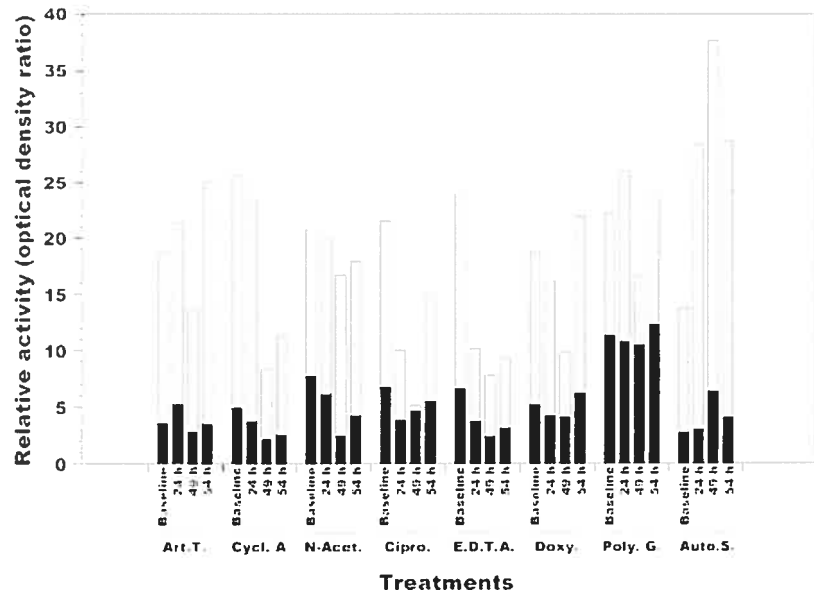
At baseline ( $-24$  h), all relative gelatinase activities were similar. After 24 h of treatment, gelatinase activity was marginally smaller in the group that received EDTA solution than in the control group ( $P = 0.0538$ )<sup>b</sup>. At 49 h, the total relative activity of gelatinase was higher in the group that received the autoserum ( $P > 0.0001$ ) than in the control group. At 54 h, total relative gelatinase activity in the EDTA group was significantly lower than the control group ( $P = 0.02$ ).

Because of the unexpected results observed with the autoserum, results were analyzed by excluding the data related to this group. Following this exclusion, time had a significant effect ( $P = 0.0098$ ). However, the global relative gelatinase activity of each treatment was still similar to the activity of the control group. At 49 h, the gelatinase activity of all groups was significantly lower than the baseline activity ( $P = 0.0057$ )<sup>c</sup>. Despite the significant treatment effect ( $P = 0.02$ ), there was no difference between each treatment group and the control group. At baseline, 24 h and 54 h, we noted the same trends that occurred in the full analysis. Basal and total gelatinase activity vs. time is shown in Fig. 3.

### DISCUSSION

Basal gelatinase physiological activity in the tear film and its subsequent increase in a pathological situation are clearly evident in dogs and many other animal species.<sup>1-8</sup> This study demonstrates the importance of studying enzymes in their latent form in comparison with their active form in normal dog tear film. The difference between a predominance of the

Figure 3. Graph representing means for basal and total gelatinase relative activity vs. time. Gelatinase activity in dog receiving autoserum increases and shows a completely different evolution. Legend: black, basal gelatinase relative activity; light gray, total gelatinase relative activity.



latent form and the minimal presence of the active form is responsible for a total activity that is significantly greater than the basal activity in this study. To the best of our knowledge, no study has yet shown the importance of this gap in dogs. There are however, many studies conducted in humans that confirm the presence of MMPs-2 and MMPs-9 to be more prominent in latent form, as well as a near absence in basal enzyme activity associated with gelatinase in the healthy human subjects that were examined.<sup>1,2,5,35,36</sup> Given that minimal gelatinase activity has been reported in the literature for healthy subjects, it was surprising to observe a detectable basal activity in all dogs. In addition to a possible species-related difference, some technical details set this study apart from those that were conducted in humans such as the test used to detect enzyme activity, the volume of collected samples, the sampling technique that was used, and the activation of MMPs following frost and thaw sequences.<sup>35</sup> All of these factors are important to consider because they could explain the consistent detection of basal activity in normal dogs' tear film. Nevertheless, it remains important to consider interspecies differences. Dogs could experience a more important gelatinase enzyme activity than humans in a normal physiological state. However, the slight basal enzyme activity that was obtained in this study corresponds to the enzyme component reported in the literature: almost all of these enzymes that were present in the healthy tear film are in latent form. Once activated, that latent enzyme activity then becomes easier to detect.

Ethylenediaminetetraacetic acid is a powerful enzyme inhibitor that has been recognized for many years and is commonly used in the laboratory to inhibit the enzyme activity specific to MMPs.<sup>35,37</sup> Its *in vivo* efficacy was therefore predictable. This study's results are similar to those of Ollivier, who demonstrated a 99.4% enzyme activity reduc-

tion with the use of *in vitro* EDTA.<sup>23</sup> Even if the inhibition obtained with EDTA was not statistically different from the other agents that were examined in this study, EDTA differentiated itself from the other agents with the highest level of enzyme inhibition associated with MMPs. It would however, be important to verify its effect on enzymes and the corneal epithelium in ulcerative cases, because some authors report an EDTA toxic potential at a concentration of 0.37%.<sup>38</sup> Ollivier and his colleagues report an EDTA inhibitory potential with a concentration as low as 0.2%.<sup>23</sup> Such a decreased concentration of EDTA may show less epithelial toxicity and still be efficacious in controlling the MMP activity.

Although the autoserum preparation and preservation steps followed in this study are similar to that of other studies, the application of autoserum led to an increase in gelatinase physiological activity. The autoserum does not consequently seem to be effective in reducing *in vivo* enzyme activity in healthy subjects in this study. This observation is contrary to reports in the literature, which usually demonstrate the potential of autoserum as an enzyme inhibitor.<sup>23,26</sup> Autoserum is regularly used clinically to enhance corneal healing and reduce gelatinase activity.<sup>28,29</sup> Autoserum's mechanism of action can partially explain these differences in findings. Alpha-2-macroglobulin is the main protein component providing inhibition against MMPs. However, this protein is only effective against active proteases.<sup>39,40</sup> As previously stated, the healthy dog eye contains very few active gelatinases. In addition, Sobrin and collaborators demonstrated that autoserum contains substances capable of inhibiting and activating gelatinase activity.<sup>24</sup> In fact, many cytokines, enzymes, and growth factors are likely to favor the expression and the activation of gelatinases. For instance, platelet-activating factor (PAF) used *in vitro* has been shown to increase MMP-9 expression by cornea epithelial cells.<sup>41</sup>

On the other hand, in the case of corneal ulcers, a greater proportion of active enzymes may favor the action of alpha-2-macroglobulin on MMPs, giving autoserum a greater potential for effectiveness against active MMPs. Itoi and collaborators observed an interspecies variation in the efficacy of serum to control enzyme activity.<sup>42</sup> Hence, interspecies specificity could explain the difference between the ineffectiveness of autoserum used in this study and its effectiveness when used in many studies that were conducted on horses.<sup>24,29</sup>

Despite the potential that is reported in the literature,<sup>23,26</sup> N-acetylcysteine did not significantly reduce gelatinase activity in this study in healthy subjects. It is possible that some elements that were not present *in vitro*, such the washing effect of tears or the physiological tear dynamics, interacted during the *in vivo* application of N-acetylcysteine, thus reducing its efficacy. Also, the application in healthy eyes may have limited its neutralizing action via active enzymes or via its suppressive action on macrophages. The administration rate, which is commonly recommended for N-acetylcysteine during ulcerated keratitis is one drop every 1–4 h;<sup>25,28</sup> however, this agent was only administered at 6-h intervals in this study. It is possible that N-acetylcysteine action was completely dissipated at sampling time. However, it is difficult to explain why, at 1 h after the application of the last treatment, the enzyme activity decrease was not distinguishable from that of the control group.

In many studies, doxycycline and other agents of the same family have also demonstrated a potential for inhibiting gelatinase activity *in vitro*.<sup>22–24</sup> Nevertheless, doxycycline did not distinguish itself from the control treatment during this study. The lack of efficacy that is reported here may be linked to many factors. First, the use of normal subjects underestimates the anti-inflammatory properties of doxycycline capable of diminishing MMP-9 activity. Secondly, because doxycycline's mechanism of action is suggested to be suppression of interleukins/enzyme expression by inflammatory cells,<sup>43</sup> the constituents of a normal corneal surface, almost clear of inflammatory cells, would not allow to adequately inhibit the factors contributing to gelatinase activation. Thirdly, the concentration that was used (0.001%), which is effective *in vitro*,<sup>36</sup> is possibly insufficient for *in vivo* use. Sobrin and colleagues reported a MMP-9 activity inhibition of 81% using doxycycline at the same concentration used in this study.<sup>24</sup> However, doxycycline was used *in vitro* in incubation during cell culture for a 24-h period, thus permitting an extended contact. Ollivier and colleagues observed a 98.8% inhibition of gelatinase activity with doxycycline *in vitro* at a concentration 100 times higher than what was used in this study.<sup>23</sup> For these reasons, further studies are necessary to determine the *in vivo* enzyme inhibition efficacy of doxycycline at a greater concentration.

The inefficacy of polysulfated glycosaminoglycans in inhibiting gelatinases in this study can be explained by the fact that they are better known for inhibiting plasmin, another proteolytic enzyme also involved in corneal ulcers.<sup>8,30</sup> In a pathological state, PSGAG could prove to be

effective via the inhibition of plasmin, which would keep it from activating latent gelatinase in active form.

Unlike the other agents, cyclosporine A was applied at 12-h intervals. It is possible that a more frequent application would have provided a greater inhibition of MMPs. However, once again, enzyme inhibition via lymphocyte immunosuppression, which is expected from cyclosporine A, may have given better results in a pathological situation.

The overall tendency of enzyme reduction at 49 h may be explained by the proximity of the last treatment to the sampling time. Thus, the therapeutic effect of the agents that were used may only last for a very short period. Nevertheless, despite the absence of a known inhibitory potential, a reduction in enzyme activity at 49 h is also noted following the application of artificial tears and ciprofloxacin. This can mainly be explained by a washing effect via the administration of a solution to the eye or a reactive increase in tear production. Moreover, the presence of preserving agents such as EDTA in these two preparations could also cause an inhibition of the slight enzyme activity, which is physiologically present. Consequently, the simple dilution of the enzymes that are present on the corneal surface could have a therapeutic benefit in pathological situations where the enzyme surplus needs to be limited.

The doses and frequencies of use that were chosen correspond in all cases to therapeutic dosages reported in the literature in accordance with clinical findings. However, it is possible that the physico-chemical characteristics of some agents that were studied limit their therapeutic properties when they are used *in vivo*. For instance, tetracycline, an agent similar to doxycycline, does not penetrate intact cornea well at the time of application. Yet penetration may be increased in the case of epithelial lesions. This would favor its accumulation as well as its action in ulcerative condition. The absence of corneal lesions could similarly explain the inefficacy observed for some products used in this study in comparison with other studies that were conducted *in vitro*.

The use of a Latin square design allows for a higher power of analysis even in the presence of a low N number. EDTA efficacy could be confirmed with statistical significance despite a small population size for each treatment group. However, the inability to demonstrate other significant reductions in activity or significant effect of other treatments may be related to the low N number, making it more difficult to reject a null hypothesis when changes were more subtle. For this reason, it is not possible to exclude the potential efficacy of other agents.

Considering the variety of enzymes and the complexity of the factors that are involved during ulcerative keratitis, a study on artificially induced ulcerative keratitis in a controlled environment is necessary to confirm or validate the effectiveness of EDTA as well as the potential of other agents on all proteases, possibly involved in a melting ulcerative process. However, the eventual transposition of this study to clinical cases would be most valid and would have the advantage of including a maximum of factors commonly

used *in vivo*, but whose integral reproduction proves difficult in an experimental model. Finally, based on the large variety of proteases involved in ulcerative keratitis, a combined use of many inhibiting agents would ensure a spectrum of action that is wider and more profitable for the treatment of canine melting corneal ulcers.

## CONCLUSION

In conclusion, this study suggests that only EDTA would allow for a significant decrease in gelatinase activity usually present on the canine corneal surface, over an extended period of time. Consequently, the use of this agent could significantly help reduce gelatinase activity compared to other agents that are commonly used. However, because of the limitations of our study, it is not possible to exclude the inhibitory potential of the other agents. Further studies are also required in pathological conditions to validate these findings.

## ACKNOWLEDGMENT

The authors express appreciation to Dr Guy Beauchamp for statistical assistance. This research was supported by Fond du Centenaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal. The authors are also grateful to Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies du Gouvernement du Québec, to Pfizer Canada Inc., and to the Faculté de Médecine Vétérinaire and the Faculté des Études Supérieures, Université de Montréal, for financial support. Finally, the authors gratefully acknowledge Dr Johanne Martel-Pelletier and Francois Mineau from Arthrolab, CHUM-Pavillon Notre-Dame Montréal-Québec, Canada for technical support and pieces of advice.

## REFERENCES

1. Geerling G, Jousen AM, Daniels JT *et al.* Matrix metalloproteinases in sterile corneal melts. *Annals of the New York Academy of Science* 1999; **878**: 571–574.
2. Kumagai N, Yamamoto K, Fukuda K *et al.* Active matrix metalloproteinases in the tear fluid of individuals with vernal keratoconjunctivitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2002; **110** (3): 489–491.
3. Leonardi A, Brun P, Abatangelo G *et al.* Tear levels and activity of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 in vernal keratoconjunctivitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2003; **44** (7): 3052–3058.
4. Pineda-Bolivar F, Garcia-Sanchez GA, Franco-Bourland R *et al.* Evaluation of tear film metalloproteinases in normal dogs and in dogs with ulcerative keratitis (Abstract). *Proceedings of the International Society of Veterinary Ophthalmology* 2001: 13.
5. Sakimoto T, Shoji J, Sawa M. Active form of gelatinases in tear fluid in patients with corneal ulcer or ocular burn. *Japanese Journal of Ophthalmology* 2003; **47** (5): 423–426.
6. Smith VA, Rishmawi H, Hussein H *et al.* Tear film MMP accumulation and corneal disease. *British Journal of Ophthalmology* 2001; **85** (2): 147–153.
7. Strubbe DT, Brooks DE, Schultz GS *et al.* Evaluation of tear film proteinases in horses with ulcerative keratitis. *Veterinary Ophthalmology* 2000; **3** (2–3): 111–119.
8. Willeford KO, Miller WW, Abrams KL *et al.* Modulation of proteolytic activity associated with persistent corneal ulcers in dogs. *Veterinary Ophthalmology* 1998; **1** (1): 5–8.
9. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry* 1999; **274**: 21491–21494.
10. Woessner JF. The matrix metalloproteinase family. In: *Matrix Metalloproteinases*. (eds Parks WC, Mechem RP) Academic Press, San Diego, 1998; 1–13.
11. Fini ME, Girard MT. Expression of collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinases by normal cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1990; **31** (9): 1779–1788.
12. Nagase H, Okada Y. Proteinases and matrix degradation. In: *Textbook of Rheumatology*, 5th edn. (eds Kelley WN *et al.*) W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1997; 323–338.
13. Sivak JM, Fini ME. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Progress in Retinal and Eye Research* 2002; **21** (1): 1–14.
14. Wong TT, Sethi C, Daniels JT *et al.* Matrix metalloproteinases in disease and repair processes in the anterior segment. *Survey of Ophthalmology* 2002; **47** (3): 239–256.
15. Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 1997; **91** (4): 439–442.
16. Fini ME, Girard MT, Matsubara M. Collagenolytic/gelatinolytic enzymes in corneal wound healing. *Acta Ophthalmologica Supplementum* 1992; **202**: 26–33.
17. Matsubara M, Zieske JD, Fini ME. Mechanism of basement membrane dissolution preceding corneal ulceration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1991; **32** (13): 3221–3237.
18. Todd SD, Brooks DE, Willis-Goulet H *et al.* Evaluation of proteases in the tear film of normal equine eyes and equine eyes with ulcerative keratitis (Abstract). *28th Annual Meeting of the American College of Veterinary Ophthalmologists* 1997; **101**: 56.
19. Garrana RM, Zieske JD, Assouline M *et al.* Matrix metalloproteinases in epithelia from human recurrent corneal erosion. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1999; **40** (6): 1266–1270.
20. Ye HQ, Azar DT. Expression of gelatinases A and B, and TIMPs 1 and 2 during corneal wound healing. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1998; **39** (6): 913–921.
21. Dursun D, Kim MC, Solomon A *et al.* Treatment of recalcitrant recurrent corneal erosions with inhibitors of matrix metalloproteinase-9, doxycycline, and corticosteroids. *American Journal of Ophthalmology* 2001; **132** (1): 8–13.
22. Golub LM, Ramamurthy NS, McNamara TF *et al.* Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 1991; **2** (3): 297–321.
23. Ollivier FJ, Brooks DE, Kallberg ME *et al.* Evaluation of various compounds to inhibit activity of matrix metalloproteinases in the tear film of horses with ulcerative keratitis. *American Journal of Veterinary Research* 2003; **64** (9): 1081–1087.
24. Sobrin L, Liu Z, Monroy DC *et al.* Regulation of MMP-9 activity in human tear fluid and corneal epithelial culture supernatant. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2000; **41** (7): 1703–1709.
25. Ward DA. Ocular pharmacology. In: *Veterinary Ophthalmology*, 3rd edn. (ed. Gelatt KN) Lippincott/Williams & Wilkins, Philadelphia, 1999; 336–354.
26. Haffner JC, Fecteau KA, Eiler H. Inhibition of collagenase breakdown of equine corneas by tetanus antitoxin, equine serum, and acetylcysteine. *Veterinary Ophthalmology* 2003; **6** (1): 67–72.

27. Slansky HH, Berman MB, Dohlman CH *et al.* Cysteine and acetylcysteine in the prevention of corneal ulceration. *Annals of Ophthalmology* 1970; **2**: 488–493.
28. Whitley DR, Gilger BC. Diseases of the canine cornea and sclera. In: *Veterinary Ophthalmology*, 3rd edn. (ed. Gelatt KN) Lippincott/Williams & Wilkins, Philadelphia, 1999; 635–673.
29. Poon AC, Geerling G, Dart JK *et al.* Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and *in vitro* toxicity studies. *British Journal of Ophthalmology* 2001; **85** (10): 1188–1197.
30. Miller WW. Using polysulfated glycosaminoglycans to treat persistent corneal erosion in dogs. *Veterinary Medicine* 1996; **91** (10): 916–922.
31. Gratzek AT, Kaswan RL, Martin CL *et al.* Ophthalmic cyclosporine in equine keratitis and keratouveitis: 11 cases. *Equine Veterinary Journal* 1995; **27** (5): 327–333.
32. Kruit PJ. Cyclosporine A treatment in four cases with corneal melting syndrome. *Transplantation Proceedings* 1988; **20** (3): 4): 170–172.
33. Mathews AG. Cyclosporine A and the equine cornea. *Equine Veterinary Journal* 1995; **27** (5): 320–321.
34. Bjerrum KB, Prause JU. Collection and concentration of tear proteins studied by SDS gel electrophoresis. Presentation of a new method with special reference to dry eye patients. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 1994; **232** (7): 402–405.
35. Barro CD, Romanet JP, Fdili A *et al.* Gelatinase concentration in tears of corneal-grafted patients. *Current Eye Research* 1998; **17** (2): 174–182.
36. Li DQ, Lokeshwar BL, Solomon A *et al.* Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells. *Experimental Eye Research* 2001; **73** (4): 449–459.
37. Berman M, Dohlman C. Collagenase inhibitors. *Archives D'ophtalmologie et Revue Générale D'ophtalmologie* 1975; **35** (1): 95–108.
38. Corbett MC, O'Brart DP, Patmore AL *et al.* Effect of collagenase inhibitors on corneal haze after PRK. *Experimental Eye Research* 2001; **72** (3): 253–259.
39. Twining SS. Regulation of proteolytic activity in tissues. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 1994; **29** (5): 315–383.
40. Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB* 1991; **5** (8): 2145–2154.
41. Tao Y, Bazan HEP, Bazan NG. Platelet-activating factor induces the expression of metalloproteinases-1 and -9 but not -2 or -3, in the corneal epithelium. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1995; **36** (2): 345–354.
42. Itoi M, Gnadinger MC, Slansky HH *et al.* Collagenase in the cornea. *Experimental Eye Research* 1969; **8** (3): 369–373.
43. Solomon A, Rosenblatt M, Li DQ *et al.* Doxycycline inhibition of interleukin-1 in the corneal epithelium. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2000; **41** (9): 2544–2557.

## **CHAPITRE 8: Analyse des résultats et discussion**

### **8.1 Activité enzymatique des métalloprotéinases: Généralités**

Dans notre étude, étant donné l'utilisation du modèle sain, nous avons cru important de faire la distinction entre l'activité basale, mesurant les enzymes sous forme active, et l'activité totale, mesurant les enzymes sous forme latente et sous forme active. L'importance d'identifier les différentes formes relève de l'efficacité de certains agents à agir sur la forme latente et/ou sur la forme active de l'enzyme.

Les résultats de cette étude ont déterminé une très faible activité de base des gélatinases. L'augmentation subséquente de l'activité enzymatique après activation avec de l'APMA, démontre l'importance des formes latentes par rapport aux formes actives présentes dans tous nos échantillons. Ce résultat concorde avec plusieurs études qui confirment la très faible proportion, parfois même l'absence, des gélatinases sous forme active dans le film de larmes normal (Barro et al., 1998; Sakimoto, Shoji et Sawa, 2003). Cette faible activité a rendu la détection plus sensible aux erreurs de variation, et la démonstration d'une inhibition significativement différente du contrôle plus laborieuse étant donné le faible écart entre les valeurs d'activités. De plus, l'inhibition engendrée par le traitement contrôle, due aux raisons qui seront discutées plus loin, ont aussi contribué à embrouiller certains résultats.

#### **8.1.1 Pourquoi avoir choisi l'ensemble commercial de détection des gélatinases ?**

Pour des raisons d'efficacité technique, nous avons favorisé un ensemble commercial de détection enzymatique des gélatinases au lieu de la zymographie pour effectuer nos

analyses. Cet ensemble d'analyses possède une sensibilité de détection comparable à la zymographie (Ratnikov et al., 2000). Ainsi, la faible activité présente dans un environnement physiologique normal, ne confère aucun avantage à un test plutôt qu'à l'autre.

En contre partie, l'ensemble de détection des gélatinases a comme inconvénient de manquer de spécificité. En effet, d'autres enzymes naturelles qui sont capables d'agir sur le substrat biotinisé peuvent modifier les résultats d'activité subséquente. Afin de limiter ce type d'erreur, nous avons pris soin d'ajouter des inhibiteurs spécifiques aux autres classes enzymatiques et d'effectuer deux analyses simultanées pour chaque échantillon, soit avec et sans EDTA.

De plus, contrairement à la zymographie, le test choisi ne permet pas d'évaluer séparément les MMPs-2 et les MMPs-9. Bien qu'il soit intéressant de constater la progression différente des deux enzymes, l'objectif principal de notre étude était d'évaluer l'activité globale des gélatinases. À cause de leur ressemblance moléculaire, il est peu probable qu'un agent inhibe l'une sans inhiber l'autre. Par conséquent, le but n'était pas d'évaluer la quantité précise de chaque enzyme, mais bien d'apprécier le niveau global d'activité des gélatinases. Pour ces raisons, la technique retenue répondait aux objectifs visés par notre étude.

Par soucis de précision, nous avons néanmoins réalisé, en parallèle, des zymographies à partir de huit échantillons activés. Le but de cet exercice n'était pas de déterminer la proportion des formes actives versus latentes, mais uniquement de définir la présence de MMP-2 et/ou de MMP-9.

Tel que déjà démontré dans plusieurs études effectuées chez l'humain (Geerling et al., 1999; Sakimoto, Shoji et Sawa, 2003), MMP-9 est une composante régulière du film de



larmes canin normal. MMP-2 aussi identifié, se retrouve de façon moins constante et moins importante. Ces résultats, s'expliquent par l'origine de chaque enzyme. Les MMPs-9 sont synthétisées par les cellules épithéliales alors que les MMPs-2 le sont par les kératocytes se trouvant sous la couche épithéliale et donc, moins en contact avec le film de larmes, lorsque l'épithélium cornéen est intact.

### **8.1.2 Influence des préparations ophtalmiques**

Le manque d'uniformité entre les différentes préparations ophtalmiques est certainement une faiblesse de notre étude. Les larmes artificielles qui ont servi de contrôle auraient dû servir de base commune à toutes les préparations. Dans notre cas, le *Ciloxan*® et l'autosérum furent administrés tels quels, alors que la cyclosporine A était préparée à partir de larmes artificielles différentes avec des agents de conservation différents (Compendium 2001). Sachant que les propriétés chimiques et physiques peuvent influencer la biodisponibilité de certaines molécules (Swan et White, 1942; Lee et Robinson, 1986), la disparité entre nos différentes préparations ophtalmiques, pourrait expliquer l'efficacité variable des agents appliqués, sans impliquer le principe actif principal.

De plus, le type de préparation ophtalmique choisi, peut aussi s'avérer responsable de certaines variations obtenues. Par exemple, le mélange inadéquat d'une suspension, avant l'application, peut modifier la pharmacocinétique d'un individu à l'autre. La fluctuation possible du contenu de chaque goutte peut ainsi entraîner une libération différente du médicament en solution.

### **8.1.3 Influence de la technique de récolte**

L'analyse du film de larmes sans modifier sa composition de base est laborieuse et difficile. Il est raisonnable de croire que tout ce qui influence la récolte et la production du film de larmes peut aussi influencer la concentration des différentes composantes du film de

larmes. Ainsi, la majorité des échantillons récoltés *in vivo* sont souvent issus des larmes réflexes. De plus, chez l'humain, le volume basal du film de larmes présent à la surface cornéenne est de l'ordre de  $8\mu\text{l}$  (Records, 1995). Supposant un volume similaire chez le chien, ceci limite le volume disponible à récolter. Par conséquent, le volume de larmes recueilli est un facteur limitant pour les analyses de laboratoires ultérieures.

Lors d'une étude préliminaire, la collecte du film de larmes au moyen de tubes micro capillaires sans irrigation cornéenne et avec ou sans stimulation lacrymale s'est avérée très variable en terme de temps de récolte et de volume prélevé d'un sujet à l'autre. Dans plusieurs cas, il s'avérait très difficile de récolter plus de  $10\mu\text{l}$ .

En contre partie, la méthode par irrigation cornéenne permet d'obtenir rapidement de façon plus régulière d'un sujet à l'autre, un volume d'échantillon plus important, et plus précis pour chaque oeil. À défaut d'obtenir un échantillon dilué, il est plus facile de manipuler des échantillons de  $80\mu\text{l}$  que de  $10\mu\text{l}$ . Des analyses préliminaires ont établi qu'un volume d'environ  $80\mu\text{l}$  par oeil était nécessaire pour effectuer toutes les analyses désirées et détecter une activité minimale de base des gélatinases.

Étant donné la nécessité d'un volume considérable, l'usage de l'ultracentrifugation, afin de concentrer les échantillons récoltés tel que décrit par Bjerrum et Prause (1994) dans leur méthode originale, n'a pu être réalisé dans notre cas.

Il est difficile de prévoir l'effet lors de l'application d'une goutte de saline à la surface cornéenne. Afin de limiter certaines variations associées à la méthode de prélèvement, celle-ci a été standardisée pour tous les prélèvements en respectant le volume de saline instillée et le temps entre l'application et le prélèvement. Néanmoins, le principal

inconvenient de la récolte par lavage cornéen demeure l'ignorance des conséquences de l'effet « goutte » sur l'activité des métalloprotéinases.

Une étude effectuée chez l'homme a révélé que la méthode par irrigation cornéenne donnait lieu à une plus grande variation des protéines totales du film de larmes entre les différents prélèvements comparativement à celle qui était obtenue suite à une production réflexe induite par bâillement volontaire : soit respectivement une différence moyenne de 16% et de 8% entre deux jours de prélèvement (Ng et al., 2000). Toutefois, la concentration des protéines totales obtenues par la méthode d'irrigation cornéenne était de l'ordre de 2mg/ml, alors que celle obtenue par la production réflexe était de 12 mg/ml. Ainsi, dans le premier cas, de très faibles variations affecteront davantage les résultats, étant donnée une concentration originale de 2mg/ml versus 12mg/ml.

L'origine des protéines semble aussi jouer un rôle dans les variations des protéines lors des prélèvements. Il a été démontré que les protéines issues des glandes lacrymales sont influencées différemment par la production lacrymale réflexe (Burgess et Kelly, 1987). Ainsi, tout moyen entraînant une stimulation lacrymale réflexe peut influencer différemment la quantité des protéines retrouvées dans le film de larmes cornéen. Cependant, il demeure difficile d'appliquer cette dynamique aux protéines ou aux enzymes provenant de la cornée telles les gélatinases. Hypothétiquement, un lavage cornéen permet peut-être d'irriguer plus efficacement l'ensemble de la cornée et d'obtenir le maximum d'enzymes et/ou de protéines cornéennes dans l'échantillon récolté. Néanmoins, il est rapporté que l'instillation d'une goutte oculaire engendre une augmentation moyenne de 30% du larmolement normal. Par la suite, deux à trois minutes sont nécessaires pour revenir à un volume lacrymal normal. Chez l'homme, le réflexe lacrymal peut persister cinq minutes après l'instillation d'une goutte aussi petite que 1 $\mu$ l (Barza et Baum, 1992). Il est donc important de récolter rapidement notre échantillon après l'application de la saline.

De plus, la morphologie oculaire et la coopération de l'animal sont aussi des facteurs qui peuvent influencer la récolte des échantillons. En effet, la récolte est beaucoup plus facile sur des yeux globuleux et « exophtalmiques » que sur de petits yeux « enophtalmiques ». Des variations individuelles quant à l'efficacité de drainage lacrymal peuvent aussi influencer la quantité et la qualité des échantillons récoltés pour chaque individu. La coopération de l'animal affecte le temps de prélèvement et l'authenticité du prélèvement. En effet, il est plus facile de respecter les délais entre l'application de la goutte et le prélèvement chez un chien calme et coopératif. Dans le même ordre d'idée, un chien plus récalcitrant risque plus de subir à la cornée et à la conjonctive des microtraumatismes au contact du micro capillaire. L'irritation engendrée favorise la libération de facteurs inflammatoires modifiant l'activité des MMPs et donnant lieu à une activité enzymatique de base augmentée.

Les précautions à prendre tel que recommandé dans la littérature pour la conservation et la manipulation des échantillons ont été respectées (Sitaramamma 1998, Bergman et Inzana, 2002; Friedberg et al., 1998).

#### **8.1.4 Analyse des résultats pour les protéines totales**

Dans cette étude, la concentration moyenne des protéines totales des échantillons obtenus par irrigation cornéenne est de  $1.89 \pm 0.35 \text{ mg/ml}$  et le temps de prélèvement moyen de  $28.2 \pm 4.0$  minutes par échantillon. Si l'on considère que la concentration moyenne du film de larmes en protéines totales chez le chien est de  $3,5 \text{ mg/ml}$  (Roberts et Erickson, 1962), nous avons un facteur de dilution de 0,54. Il est difficile de comparer cette valeur à d'autres valeurs des protéines totales canines car aucune valeur retrouvée dans la littérature n'a été obtenue de cette façon chez le chien.

La méthode par irrigation cornéenne, a démontré une variation maximale des protéines de l'ordre de 31% à la suite d'une étude effectuée chez l'humain sur une période de trois jours (Ng et al., 2000). Il est intéressant de constater qu'avec une méthode similaire, nous avons obtenu une variation moindre de 19% et ce sur une beaucoup plus grande période, soit 8 semaines. Cette différence peut s'expliquer par l'utilisation d'un plus petit nombre de sujets, huit dans notre étude contre dix-neuf, ou par l'implication d'une seule personne pour les prélèvements dans notre étude contre deux dans l'étude rapportée.

Les variations peuvent aussi s'expliquer par plusieurs facteurs. Dans un premier temps, il est possible qu'une variation physiologique normale entre individus soit en cause. Dans un deuxième temps, pour des raisons déjà discutées, l'application de saline sur la cornée demeure un élément difficilement contrôlable et imprévisible. Enfin, les différents agents employés peuvent aussi influencer la concentration des protéines totales. Néanmoins, étant donné la très faible proportion des MMPs sur les protéines totales, il demeure peu probable que la variation des MMPs soit responsable de la variation des protéines totales. Il n'est cependant pas exclu que les agents influencent le niveau des globulines ou de l'albumine.

Le niveau de variation des protéines totales entre deux prélèvements prend son importance lorsqu'il s'agit de mesurer l'efficacité d'un traitement pour réduire l'une de ses composantes. Par conséquent, si dans notre étude on considère qu'une variation de la concentration de protéines totales de 19% entre deux prélèvements est normale, une variation aussi grande entre le niveau enzymatique de deux échantillons pourrait ne pas indiquer un effet réel dû au traitement.

Enfin, lors de nos analyses, une corrélation positive entre l'activité enzymatique des gélatinases et les protéines totales a pu être démontrée dans certains cas. Il demeure cependant important de souligner que cette corrélation n'a pu être rapportée de façon

constante. Néanmoins, étant donné que certaines études favorisent les protéines totales pour comparer l'activité enzymatique entre deux échantillons plutôt que le volume, nous avons tenu compte dans nos calculs statistiques de la concentration des protéines totales.

### **8.1.5 Corrélation selon le sexe des sujets**

Le sexe de l'animal s'est aussi avéré avoir un effet sur l'activité enzymatique de base des gélatinases ( $p= 0.036$ ). En effet, dans ce cas, l'activité enzymatique chez les mâles était plus élevée que chez les femelles. Peu d'études rapportent ce phénomène. Cette différence retrouvée dans certaine catégorie peut s'expliquer par une activité enzymatique physiologique de base plus importante chez le mâle ou par une moins bonne coopération des sujets mâles lors du prélèvement.

Étrangement, il demeure important de souligner que le sexe n'a pas influencé significativement l'activité relative totale. Lors du prélèvement, les enzymes latentes seraient possiblement rapidement activées chez le mâle pour les raisons déjà mentionnées, mais sans qu'il n'y ait de nouvelle transcription de MMPs.

### **8.1.6 Pourquoi avoir choisi le modèle non ulcéré?**

Cette étude avait comme objectif de déterminer parmi plusieurs agents couramment utilisés, les plus efficaces pour contrôler l'activité des gélatinases *in vivo*. Plusieurs études similaires sont rapportées, mais la majorité ont été effectuées à partir de modèles *in vitro*. Afin d'explorer de nouveaux facteurs et de se rapprocher de la réalité clinique, nous avons opté pour un modèle *in vivo* sain. La suite logique étant de conserver le ou les agents qui auront été les plus efficaces en milieu non ulcéré, pour élaborer une seconde étude en mode ulcératif.

L'usage d'un modèle cornéen sain comme première approche a permis de réduire le nombre de chiens nécessaires à l'étude et d'évaluer plus d'agents pharmacologiques potentiels. En mode ulcératif, chaque chien n'aurait pu être utilisé plus de 2 fois, à moins de créer un ulcère cornéen sur un œil antérieurement touché.

D'autre part, en plus de pouvoir utiliser les mêmes chiens sur plusieurs semaines et ainsi réduire le nombre de chiens nécessaires, l'emploi d'un carré latin nous a permis d'utiliser chaque chien pour son propre contrôle malgré la faible taille de l'échantillon (n=8).

## **8.2 Activité enzymatique des gélatinases: Résultats**

### **8.2.1 Corrélation entre l'activité de base vs l'activité totale**

Le modèle linéaire mixte, avec individu comme facteur aléatoire, démontre une relation positive et significative entre l'activité enzymatique de base et l'activité enzymatique totale ( $p < 0,0001$ ). Selon la formule suivante, il est donc possible de prévoir mathématiquement l'activité enzymatique relative totale (y) lorsque l'on connaît l'activité enzymatique relative de base (x), et vice versa.

$$y = 0,649x + 0.279$$

### **8.2.2 Évolution de l'activité relative de base**

L'évolution de l'activité enzymatique relative de base n'a pas permis de démontrer un effet significatif du temps ou une interaction entre les traitements et le temps. Toutefois, un effet du traitement avec une activité enzymatique de base significativement plus grande pour les sujets ayant reçu des glycosaminoglycans polysulfatés (GAGPS) a pu être calculée. Cet effet est difficilement explicable pour deux raisons. D'abord il se retrouve sur toute la période de traitement incluant le temps zéro. À ce point, aucun sujet n'avait encore reçu de traitement oculaire. De plus, bien que l'activité enzymatique semble plus élevée dans ce

groupe de chiens, l'activité enzymatique évolue très peu par rapport au temps initial (i.e. 11,40; 10,85; 10,51; et 12,28). Il devient ainsi difficile d'attribuer uniquement aux glycosamynoglycans polysulfatés, l'activité enzymatique supérieure. En excluant le groupe ayant reçu des GAGPS de l'analyse statistique, l'effet traitement disparaît avec un p qui passe de 0,0011 à 0,84.

### 8.2.3 Évolution de l'activité relative totale

L'activité relative totale varie significativement entre les différents groupes de traitement. De plus, les traitements semblent posséder un effet différent selon la période. À 49 heures, la plus faible activité des gélatinases a été notée dans sept traitements sur huit par rapport à l'activité initiale de chaque groupe : EDTA (-68%), ciloxan (-76%), cyclosporine A (-68%), doxycycline (-47%), larmes artificielles (-26%), glycoamynoglycans polysulfatés (-25%) et acétylcystéine (-20%). Toutefois, aucune différence significative n'a pu être détectée entre les groupes de traitement et le groupe contrôle. Enfin, malgré cette tendance générale où l'activité relative totale diminue à 49 heures pour remonter à 54 heures, aucun effet significatif du temps n'a pu être confirmé lors de nos premiers calculs.

#### 8.2.3.1 Autosérum

L'évolution de l'activité relative totale chez les chiens ayant reçu de l'autosérum est complètement opposée à celle obtenue au cours des autres traitements. Au lieu d'observer une diminution maximale à 49 heures, nous constatons un pic d'activité qui s'atténue à 54 heures. L'auto sérum ne semble donc pas efficace pour réduire l'activité enzymatique de façon *in vivo* chez des sujets sains. Cette constatation est contraire à la majorité des observations retrouvées dans la littérature qui démontre le potentiel intéressant de l'autosérum. En effet, l'autosérum est régulièrement utilisé pour favoriser la guérison cornéenne et diminuer l'activité des gélatinases en clinique (Tsubota et al., 1999; Campos et al., 2001; Poon et al., 2001; Whitley et Gilger, 1999). De plus, ayant déjà démontré une



efficacité considérable pour réduire l'activité enzymatique *in vitro* (Haffner, Fecteau et Eiler, 2003; Ollivier et al., 2003), cela rend nos observations davantage surprenantes. Cette évolution est notable malgré des étapes de préparation et de conservation de l'autosérum similaires à celle des autres études.

Le mécanisme d'action de l'autosérum peut expliquer ces constatations. L' $\alpha_2$ -macroglobuline, qui confère la propriété inhibitrice des MMPs, est uniquement efficace contre les protéases actives (Twining, 1994; Woessner, 1991). Comme mentionné précédemment, l'environnement sain de notre étude contient très peu de gélatinases actives et plus de gélatinases sous forme latente (Barro et al., 1998; Sakimoto, Shoji et Sawa, 2003). De plus, les travaux de Sobrin et al. (2000) ont démontré que l'autosérum contient des substances capables d'inhiber et d'activer l'activité de gélatinases. En effet, plusieurs cytokines, enzymes et facteurs de croissance sont susceptibles de favoriser l'expression et l'activation des gélatinases. Par exemple, le facteur d'activation plaquettaire (PAF) utilisé *in vitro* a permis, lors d'une étude (Tao, Bazan et Bazan, 1995), d'augmenter l'expression des MMP-9 par les cellules épithéliales de la cornée.

En contre partie, lors d'ulcère cornéen, le ratio plus important d'enzymes actives favorise peut-être l'action de l' $\alpha_2$ -macroglobuline qui possède alors un fort degré d'efficacité pour se lier aux MMPs actives.

Dans leur étude, Itoi et al. (1969) constatent une variation inter espèce de l'efficacité du sérum pour contrôler l'activité enzymatique. Par conséquent, cette spécificité inter espèce pourrait aussi expliquer la différence entre l'inefficacité de l'autosérum dans notre étude, versus l'efficacité de ce dernier dans plusieurs études effectuées chez le cheval.

Étant donné l'évolution aberrante des valeurs d'activité relative totale des chiens ayant reçu de l'autosérum, lors d'une analyse ultérieure, nous avons exclu les données de ce groupe. Cette fois, tous les paramètres étudiés sont devenus significatifs : l'effet traitement avec un  $p$  de 0,022; l'effet du temps avec un  $p$  de 0,0098; et l'interaction entre le temps et le traitement avec un  $p$  de 0,019. Les analyses plus poussées de ce pool d'échantillons (donc excluant l'autosérum) ont permis de conclure que l'activité relative totale de tous les traitements incluant ceux du groupe contrôle, était significativement plus faible à 49 heures qu'au temps zéro, tous traitements confondus ( $p = 0,0057$ ). La proximité de la dernière application, soit de une heure, est sans aucun doute la principale raison qui explique cette importante réduction.

Outre une durée d'action de courte durée, deux autres éléments peuvent expliquer cette diminution, qui se retrouve aussi dans le groupe contrôle. Dans un premier temps, l'application de gouttes pourrait, à court terme, favoriser un « nettoyage » cornéen en diminuant la quantité d'enzymes présentes à la surface et dans le film de larmes. Ainsi, la simple dilution des enzymes à la surface cornéenne aurait un avantage thérapeutique. Dans un deuxième temps, les agents de conservation tel que l'acide édétique disodique dans les larmes artificielles *Hypotear*® utilisé pour fabriquer plusieurs des solutions ophtalmiques dans notre étude, pourrait aussi engendrer une baisse d'activité à la surface cornéenne. Ceci ne s'applique pas pour l'auto sérum, qui ne contient aucun agent de conservation et la cyclosporine A qui est fabriquée à partir d'une autre solution oculaire, sans chélateur calcique.

### **8.2.3.2 EDTA**

Toujours après avoir exclu du calcul le groupe de sujet traité avec de l'auto sérum, il est intéressant de noter que l'effet du traitement diffère selon les périodes. Au temps 0, aucun effet du traitement n'est constaté; donc les activités relatives totales de départ de tous les

groupes sont similaires. À 24 heures, un effet significatif du traitement est observé ( $p = 0,012$ ) et les sujets traités avec la solution d'EDTA 1% ont une activité plus faible, mais non significative, que ceux du groupe contrôle ( $p = 0,0545$ ). À 49 heures, on retrouve aussi un effet du traitement ( $p = 0,02$ ), cependant aucun agent ne s'est démarqué du groupe contrôle. Enfin, à 54 heures on retrouve aussi un effet significatif du traitement ( $p = 0,014$ ) et les sujets traités avec la solution EDTA 1% se démarquent du groupe contrôle avec un  $p$  de 0,0169.

Ainsi, au cours de cette étude, malgré le potentiel d'inhibition enzymatique *in vitro* des différents agents employés, on constate, *in vivo*, que cette inhibition est de courte durée car une hausse de l'activité est observée dans sept cas sur huit, six heures après le dernier traitement (54 heures). Seule la solution EDTA 1% a permis de réduire significativement l'activité des gélatinases sur une plus longue période. Cette propriété confère à ce médicament un potentiel inhibiteur plus intéressant que les autres. L'EDTA est un inhibiteur enzymatique puissant reconnu depuis plusieurs années et couramment utilisé en laboratoire pour inhiber l'activité enzymatique spécifique au MMPs (Barro et al., 1998; Berman et Dohlman, 1975). Son efficacité *in vivo* était donc prévisible.

Nos résultats sont similaires à ceux de Ollivier et al. (2003), qui ont démontré une réduction de l'activité enzymatique de l'ordre de 99,4% en employant l'EDTA *in vitro*. Même si dans leur étude l'inhibition par l'EDTA n'était pas statistiquement différente des autres agents, cet agent s'est démarqué avec le plus haut taux d'inhibition des métalloprotéinases.

Néanmoins, il serait important de vérifier son efficacité sur les enzymes et sur le reste de l'épithélium cornéen en mode ulcératif, puisque certains auteurs rapportent un potentiel toxique de l'EDTA pour les cellules épithéliales de la cornée à une concentration aussi basse que 0,37% (Corbett et al., 2001). Ollivier et al. (2003) rapporte un potentiel

inhibiteur à une concentration aussi faible que 0,2%. Il est possible qu'à cette concentration la toxicité de l'EDTA soit moindre.

### **8.2.3.3 Cyclosporine A**

Après plusieurs périodes de traitement, une baisse de l'activité enzymatique, non statistiquement significative, est observée. Deux explications peuvent expliquer cette diminution non significative. D'abord, contrairement aux autres agents, la cyclosporine A a été appliquée aux douze heures. Hypothétiquement, une fréquence d'application supérieure pourrait diminuer significativement l'activité enzymatique.

Dans un deuxième temps, l'environnement sain et le mécanisme d'action de la cyclosporine semblent aussi être responsables de cette observation puisque l'efficacité de cet agent a été bien démontrée lors de kératite ulcérate chez le cheval (Gratzek et al., 1995; Mathews 1995). En effet, rappelons que la cyclosporine A parvient possiblement à réduire l'activité des gélatinases indirectement par son action immunosuppressive sur les différents lymphocytes (Baumann, 1992; Mochizuki et De Smet, 1994) qui peuvent libérer et/ou activer les gélatinases (Sakimoto, Shoji et Sawa, 2003; Schultz et al., 1992; Wentworth, Paterson et Gray, 1992). Or, si l'on considère que la majorité des gélatinases produites à l'état normal prend origine de l'épithélium cornéen (MMP-9) et des kératocytes (MMP-2), il est difficile d'espérer observer un effet, tel que nous le retrouverions lors d'une kératite ulcérate compliquée.

### **8.2.3.4 N-acétylcystéine**

Malgré un potentiel rapporté dans la littérature (Berman et Dohlman, 1975; Haffner, Fecteau et Eiler, 2003; Ollivier et al., 2003), l'acétylcystéine n'a guère démontré son efficacité au cours de notre étude et ne semble donc pas efficace pour réduire l'activité enzymatique *in vivo* chez des sujets sains. Il est possible que plusieurs éléments non

considérés *in vitro*, interagissent lors de son application *in vivo* nuisant ainsi à son efficacité. De plus, l'environnement sain, limitant son action neutralisante via le groupement actif des enzymes ou par son action suppressive sur les macrophages peut aussi être mis en cause.

De plus, la fréquence d'administration couramment recommandée pour l'acétylcystéine lors de la kératite ulcéraire est une goutte à toutes les une à quatre heures (Ward, 1999; Whitley et Gilger, 1999). Ainsi, dans notre étude, cet agent n'était administré qu'à un intervalle de six heures. Il est possible, qu'au moment du prélèvement, l'action de l'acétylcystéine soit complètement dissipée. Néanmoins, à 49 heures, soit une heures après l'application du dernier traitement, la diminution de l'activité enzymatique notée à ce moment, n'a pu être démarquée de celle du groupe contrôle.

### **8.2.3.5 Doxycycline**

La doxycycline et d'autres agents de la même famille ont aussi démontré dans plusieurs études un potentiel pour inhiber l'activité des gélatinases *in vitro* (Golub et al., 1991; Sobrin et al., 2000; Ollivier et al., 2003). Néanmoins, cette dernière n'a pu se démarquer du contrôle lors de notre étude. La faible efficacité que nous rapportons peut être reliée à plusieurs facteurs.

Dans un premier temps, l'environnement sain a pour conséquence directe de sous estimer les propriétés anti-inflammatoires de la doxycycline capables de diminuer l'activité des MMPs-9. En effet, à cause des mécanismes d'action proposés de la doxycycline (Smith GN et al., 1999; Solomon et al., 2000), les constituants d'une surface cornéenne normale ne permettent pas à cette dernière d'inhiber adéquatement les facteurs contribuant à l'activation des gélatinases. Or, si ce mécanisme permet de réduire indirectement l'activation des gélatinases en milieu pathologique, en milieu sain, le faible niveau de

cytokines inflammatoires rend la doxycycline inefficace pour inhiber l'activation des enzymes latentes.

Dans un deuxième temps, la concentration employée de 10µg/ml (0,001%), efficace *in vitro* (Li et al., 2001), est possiblement insuffisante pour une utilisation *in vivo*. Sobrin et al., (2000) rapportent une inhibition de 81% de l'activité de MMP-9 en utilisant la doxycycline à cette même concentration. Toutefois, celle-ci est alors utilisée *in vitro*, en incubation lors de la culture cellulaire, pour une période de 24 heures. De son côté, Ollivier et al. (2003) ont utilisé *in vitro* la doxycycline à une concentration 100 fois supérieure à celle que nous avons utilisée. Une inhibition de 98,8% de l'activité des gélatinases a alors été observée. Pour ces raisons, des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer l'efficacité d'inhibition enzymatique *in vivo* de la doxycycline à une concentration supérieure.

#### **8.2.3.6 Glycosaminoglycans polysulfatés (GAGPS)**

Le piètre succès des GAGPS pour inhiber les gélatinases lors de notre étude s'explique par le fait qu'ils sont davantage connus pour inhiber la plasmine, une autre enzyme protéolytique aussi impliquée lors de l'ulcère cornéen. (Willeford et al., 1998; Miller, 1996). En condition pathologique, les GAGPS pourraient se montrer efficaces par l'inhibition de la plasmine, en empêchant cette dernière d'activer les gélatinases sous forme latente en forme active.

En effet, la plasmine est aussi une enzyme protéolytique dont la concentration peut augmenter lors de l'ulcère cornéen (Salonen et al., 1987). Cette enzyme peut directement agir sur le tissu environnant ou activer d'autres protéases dont les MMPs (Miller, 1996; Nagase, 1997). Ainsi, ce mécanisme d'action des GAGPS permet de comprendre pourquoi ceux-ci sont efficaces pour contrôler l'activité protéolytique et favoriser la guérison cornéenne lors d'un ulcère cornéen chez le chien (Miller, 1996; Willeford et al., 1998), mais sans avoir donné de résultats concluants dans notre étude.

### 8.2.3.7 Ciprofloxacine

Comme nous l'avons déjà mentionné, le ciprofloxacine ne possède aucune propriété inhibitrice connue des métalloprotéinases. Nous nous sommes toutefois intéressés à son action sur l'activité des gélatinases parce qu'il est souvent considéré comme antibiotique de première ligne dans les cas de kératite ulcéreuse compliquée.

Bien qu'il ne se soit pas démarqué du contrôle, les résultats obtenus sont surprenants. Le ciprofloxacine a permis d'inhiber un maximum de 76% de l'activité des gélatinases par rapport à l'activité d'origine. C'est le plus fort pourcentage d'inhibition observé parmi les agents étudiés.

Différentes hypothèses peuvent être mise de l'avant pour expliquer cette progression. Dans un premier temps, le *Ciloxan*® contient aussi plusieurs agents de conservation dont l'édétate disodique, un agent chélateur (voir section EDTA). Le *Ciloxan*®, étant fourni tel quel, n'est pas dans le même véhicule que les autres agents dissous dans le *Tears plus*® ou l'*Hypotears*®. Il est possible que la quantité d'agent de conservation soit plus importante dans le *Ciloxan*®, ce qui pourrait expliquer une plus forte inhibition enzymatique chez les chiens de ce groupe.

Dans un deuxième temps, suite à l'application locale du *Ciloxan*®, 8,6% des humains rapportent un malaise temporaire qui se présente sous forme de picotement, d'irritation ou de brûlement<sup>4</sup>. Il est possible que ses effets indésirables se retrouvent aussi chez le chien. Ainsi, selon la durée du malaise, une augmentation de la sécrétion lacrymale créée par

---

<sup>4</sup> Compendium des produits et spécialités pharmaceutiques, 36<sup>ième</sup> ed. Association des pharmaciens du Canada 2001 : p.355-356.

l'inconfort, pourrait favoriser le lavage cornéen, et indirectement diminuer la quantité de gélatinases présente à la surface cornéenne.

Enfin, il est bien connu que plusieurs bactéries pathogènes tel que *Pseudomonas sp.* (Brown, Bloomfield et Tam, 1974; Kessler, Kennah et Brown, 1977) produisent des protéases contribuant à leur virulence. Hypothétiquement, la flore bactérienne normale de la conjonctive canine (*Staphylococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium sp.* (McDonald et Watson, 1976) pourrait synthétiser une quantité de gélatinases. L'emploi de *Ciloxan*® réduirait la flore bactérienne normale et secondairement l'activité des gélatinases.

#### **8.2.4 Constatations générales**

Les résultats de nos analyses se comparent à ceux de Ollivier et al. (2003) qui malgré une réduction enzymatique considérable, n'ont noté aucune différence significative entre l'efficacité inhibitrice de l'EDTA, la N-acétylcystéine, la doxycycline et l'autosérum pour les métalloprotéinases retrouvées dans le film de larmes de cornées ulcérées équine.

Les doses et les fréquences d'application choisies correspondent dans tous les cas à des dosages thérapeutiques rapportés dans la littérature. Toutefois, il est possible que le mauvais rendement obtenu soit attribuable à une concentration ou à une fréquence d'application inappropriée. De plus, il est possible que les caractéristiques physico-chimiques limitent les propriétés thérapeutiques des agents lorsqu'ils sont employés *in vivo*. Par exemple, la tétracycline, un agent similaire à la doxycycline, pénètre mal la cornée intacte lors de son application. Toutefois, en cas de lésion épithéliale, la pénétration serait facilitée. Ceci favoriserait peut-être son accumulation et son action en condition ulcérate.



Étant donné l'efficacité partielle obtenue par les agents et le potentiel reconnu par plusieurs études pour inhiber l'activité enzymatique, une étude en mode ulcératif serait sans aucun doute nécessaire afin de vérifier l'efficacité des différents agents présents dans notre étude.

## Conclusion

Parmi plusieurs agents évalués, notre étude a révélé que seul l'EDTA peut réduire significativement l'activité constitutive des gélatinases présentes à la surface cornéenne canine saine et cela, sur une période prolongée. Par conséquent, lors d'une kératite ulcéraire compliquée *gélatinisante*, son application pourrait prévenir plus efficacement l'évolution vers une perforation cornéenne.

Une étude en mode ulcéraire serait nécessaire pour évaluer l'efficacité de l'EDTA et le potentiel des autres agents sur l'ensemble des autres protéases, incluant celles d'origine exogène (bactéries), impliquées dans un processus ulcéraire gélatinisant. Il serait également important de transposer cette étude à des cas cliniques réels. Étant donné la complexité des facteurs impliqués dans la pathologie ulcéraire cornéenne, ces derniers auraient l'avantage d'inclure un maximum de facteurs fréquemment impliqués *in vivo*, mais dont la reproduction intégrale s'avère difficile dans un modèle expérimental.

D'autre part, nous n'avons pas inclus d'inhibiteurs enzymatiques synthétiques dans notre étude étant donné leur moins grande disponibilité et leur coût plus élevé. Il demeure cependant important de souligner le développement de ces nouveaux inhibiteurs synthétiques spécifiques qui démontrent un potentiel intéressant contre l'activité indésirable des protéases. Leur plus grande accessibilité clinique dans le futur permettra de favoriser leur utilisation en ophtalmologie vétérinaire, et peut-être fournir un traitement spécifique incontestablement efficace.

## Bibliographie

Aronson SB, Moore TE. *Corticosteroids therapy in central stromal keratitis*. American Journal of Ophthalmology 1969; 67 (6): p.873-896.

Barletta JP, Angella G, Balch KC, Dimova HG, Stern GA, Moser MT, van Setten GB, Schultz GS. *Inhibition of pseudomonal ulceration in rabbit corneas by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor*. Investigative Ophthalmology & Visual Science 1996; 37 (1): p.20-28.

Barrett, PM, Scagliotti, RH, Merideth, RE, Jackson, PA, Alarcon, FL. *Absolute corneal sensitivity and corneal trigeminal nerve anatomy in normal dogs*. Progress in Veterinary and Comparative Ophthalmology 1991; 1: p.245-254.

Barro CD, Romanet JP, Fdili A, Guillot M, Morel F. *Gelatinase concentration in tears of corneal-grafted patients*. Current Eye Research 1998; 17 (2): p.174-182.

Barza M, Baum J. *Chap 61: Ocular pharmacology of antibiotics*. Dans: Duane's Foundation of Clinical Ophthalmology, vol. 2 (Tasman W, Jaeger EA ed); Philadelphie: JB Lippincott 1992: p1-5.

Baumann GG. *Molecular mechanism of immunosuppressive agents*. Transplantation Proceedings 1992; 24 (4 suppl. 2): p.4-7.

Belin MW, Bouchard CS, Frantz S, Chmielinska J. *Topical cyclosporine in high-risk corneal transplants*. Ophthalmology 1989; 96 (8): p.1144-1150.

Berger SL, King VL. *The fluctuation of tear production in the dog*. Journal of American Animal Hospital Association 1998; 34 (1): p.79-83.

Bergman RL, Inzana KD, Inzana TJ. *Characterization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in cerebrospinal fluid of clinically normal dogs.* American Journal of Veterinary Research 2002; 63(10): p.1359-62.

Berman M. *Regulation of collagenase. Therapeutic considerations.* Transactions of the Ophthalmological societies of the United Kingdom 1978; 98 (3): p.397-405.

Berman M, Dohlman C. *Collagenase Inhibitors.* Archives d'Ophtalmologie et Revue Générale d'Ophtalmologie 1975; 35 (1): p.95-108.

Berman MB, Kenyon K, et al. *The pathogenesis of epithelial defects and stromal ulceration.* Dans: The Cornea. Transaction of the World Congress on the Cornea III. (Cavanagh HD edn). New York, Raven Press 1988: p.35-43.

Bjerrum KB, Prause JU. *Collection and concentration of tear proteins studied by SDS gel electrophoresis. Presentation of a new method with special reference to dry eye patients.* Graefe's Archive for Clinical and Experimental 1994; 232 (7): p.402-405.

Borcherding MS, Blacik LJ, Sittig RA, Bizzell JW, Breen M, Weinstein HG. *Proteoglycans and collagen fibre organization in human corneoscleral tissue.* Experimental Eye Research 1975; 21 (1): p.59-70.

Brooks D. *Equine ophthalmology.* Dans: Veterinary Ophthalmology 3<sup>th</sup> ed. (Gelatt KN ed); Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphie 1999; p.1053-1116.

Brown SI. *Symposium on corneal infection and immunity. The Association for Research in Vision and Ophthalmology and National Society for the Prevention of Blindness.*

*Collagenase and corneal ulcers.* Investigative Ophthalmology & Visual Science 1971; 10 (3): p.203-209.

Brown SI, Bloomfield SE, Tam W. *The cornea-destroying enzyme of Pseudomonas aeruginosa.* Investigative Ophthalmology & Visual Science 1974; 13 (3) : p.174-180.

Brown SI, Weller CA. *Collagenases inhibitors in prevention of ulcers of alkali-burned cornea.* Archives of Ophthalmology 1970; 83 (3): p. 352-353.

Brown SI, Weller CA, Vidrich AM. *Effect of corticosteroids on corneal collagenase of rabbits.* American Journal of Ophthalmology 1970; 70 (5); p.744-747.

Brown SI, Weller CA, Wassermann HE. *Collagenolytic activity of alkali-burned corneas.* Archives of Ophthalmology 1969; 81(3): p.370-373.

Burgess TL, Kelly RB. *Constitutive and regulated secretion of proteins.* Annu Rev Cell Biol 1987; 3: p.243–293.

Burkhardt D, Ghosh P. *Laboratory evaluation of antiarthritic drugs as potential chondroprotective agents.* Seminars in arthritis and rheumatism 1987; 17 (2 Suppl 1): p.3-34.

Burstein NL, Anderson JA. *Corneal penetration and ocular bioavailability of drugs.* Journal of Ocular Pharmacology 1985; 1 (3); p 309-326.

Campos CF, Jore AT et al. *Extra and Intraocular findings in alkali induced ophthalmic lesions in dogs-acetylcysteine and blood serum effect.* Proceeding of International Society of Veterinary Ophthalmology 2001; p.5.

Carreno MR, Muniz OE, Howell DS. *The effect of glycosaminoglycan polysulfuric acid ester on articular cartilage in experimental osteoarthritis: effects on morphological variables of disease severity.* Journal of Rheumatology 1986; 13 (3): p.490-497.

Cintron C, Covington HI. *Proteoglycan distribution in developing rabbit cornea.* Journal of Histochemistry and Cytochemistry 1990; 38 (5): p.675-684.

Cochereau I. *Biodisponibilité des anti-inflammatoires.* Journal Français d'Ophthalmologie 2000; 23 (5) : p.514-517.

Corbett MC, O'Brart DP, Patmore AL, Marshall J. *Effect of collagenase inhibitors on corneal haze after PRK.* Experimental Eye Research 2001; 72 (3): p.253-259.

Costa ND, Slatter D. *Potency of n-acetylcysteine as a collagenase inhibitor in pharmaceutical preparations-effect of temperature and storage.* Australian Veterinary Journal 1983; 60: p.195-196.

Cruzot-Garcher C. *L'examen clinique du film lacrymal.* Journal Français d'Ophthalmologie 1999 ; 22 (4): p.461-466.

Doane KJ, Yang G, Birk DE. *Corneal cell-matrix interactions: type VI collagen promotes adhesion and spreading of corneal fibroblasts.* Experimental Eye Research 1992; 200 (2): p.490-499.

Dubin O, Trinquand C. *Les voies de pénétration endoculaire.* Journal Français d'Ophthalmologie 2000 ; 23 (5) : p.501-504.

Dursun D, Kim MC, Solomon A, Pflugfelder SC. *Treatment of recalcitrant recurrent corneal erosions with inhibitors of matrix metalloproteinase-9, doxycycline and corticosteroids*. American Journal of Ophthalmology 2001; 132(1): p.8-13.

Edgerton S. Dans Nasisse MP. *Canine ulcerative keratitis*. Dans: Ophthalmology in Small Animal Practice. The Compendium Collection. Veterinary learning systems, Trenton, NJ; 1996: p.45-59.

English RV. *Immune responses and the eye*. Dans: Veterinary Ophthalmology 3<sup>th</sup> ed. (Gelatt KN ed); Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphie 1999: p.239-258.

Fini ME. *Keratocyte and fibroblast phenotype in the repairing cornea*. Progress in Retinal and Eye Research 1999; 18 (4) : p.529-551.

Fini ME, Cook JR, Mohan R. *Proteolytic mechanisms in corneal ulceration and repair*. Archives of Dermatological Research 1998; 290 (suppl.): p.S12-S23.

Fini ME, Girard MT. *Expression of collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinases by normal cornea*. Investigative Ophthalmology & Visual Science 1990; 31 (9): 1779-1788.

Fini ME, Girard MT, Matsubara M. *Collagenolytic/gelatinolytic enzymes in corneal wound healing*. Acta Ophthalmologica Supplementum 1992; 202: p.26-33.

Fini ME, Parks WC, Rinehart WB, Girard MT, Matsubara M, Cook JR, West-Mays JA, Sadow PM, Burgeson RE, Jeffrey JJ, Raizman MB, Krueger RR, Zieske JD. *Role of matrix metalloproteinases in failure to re-epithelialize after corneal injury*. American Journal of Pathology 1996; 149(4): p.1287-1302.

Fleiszig SM, Zaidi TS, Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa* invasion of and multiplication within corneal epithelial cells in vitro. *Infection and Immunity* 1995; 63 (10): p.4072-4077.

Francois J, Neetens A. *Tear flow in man*. *American Journal of Ophthalmology* 1973; 76 (3): p.351-358.

Franklin RM. *The ocular secretory immune system: a review*. *Current Eye Research* 1989; 8 (6): p.599-606.

Franklin RM, McGee DW, Shepard KF. *Lacrimal gland-directed B cell responses*. *Journal of Immunology* 1985; 135 (1): p.95-99.

Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J, Lopez-Otin C. *Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas*. *Journal of Biology and Chemistry* 1994; 269 (24): p.16766-16773.

Friedberg MH, Glantz MJ, Klempner MS, Cole BF, Perides G. *Specific matrix metalloproteinase profiles in the cerebrospinal fluid correlated with the presence of malignant astrocytomas, brain metastases, and carcinomatous meningitis*. *Cancer* 1998; 82 (5): p.923-930.

Frucht-Pery, J, Sagi, E, Hemo, I, Ever-Hadani, P. *Efficacy of doxycycline and tetracycline in ocular rosacea*. *American Journal of Ophthalmology* 1993; 116 (1): p.88-92.



Fullard Rj, Snyder C. *Protein levels in nonstimulated and stimulated tears of normal human subjects.* Investigative Ophthalmology & Visual Science 1990; 31 (6): p.1119-1126.

Galis ZS, Asanuma K, Godin D, Meng X. *N-acetyl-cysteine decreases the matrix-degrading capacity of macrophage-derived foam cells: new target for antioxidant therapy?* Circulation 1998; 97 (24): p.2445-2453.

Garrana RM, Zieske JD, Assouline M, Gipson IK. *Matrix metalloproteinases in epithelia from human recurrent corneal erosion.* Investigative Ophthalmology & Visual Science 1999; 40 (6): p. 1266-1270.

Gaster RN, Leopold H. *Chap : 46. Pharmacologic principles in the treatment of corneal disease.* Dans: Duane's Foundation of Clinical Ophthalmology, vol. 3. (Tasman W, Jaeger EA, eds); Philadelphie: JB Lippincott 1992: p1-11.

Geerling G, Joussen AM, Daniels JT, Mulholland B, Khaw PT, Dart JK. *Matrix metalloproteinases in sterile corneal melts.* Annals of the New York Academy of Sciences 1999; 878: p.571-574.

Gelatt KN, Samuelson DA. *Recurrent corneal erosion and epithelial dystrophy in the Boxer dog.* Journal of the American Animal Hospital association 1982; 18: p.453-460.

Gerding PA Jr, Kakoma I. *Microbiology of the canine and feline eyes.* The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice 1990; 20 (3): p.615-625.

Gerding PA Jr, McLaughlin SA, Troop MW. *Pathogenic bacteria and fungi associated with external ocular diseases in dogs: 131 cases (1981-1986)*. Journal of American Veterinary Medical Association 1988; 193 (2): p.242-244.

Gilger BC, Allen JB. *Cyclosporine A in veterinary ophthalmology*. Veterinary Ophthalmology 1998; 1 (4): p.181-187.

Glenwood GG, Gelatt KN, Ofri R. *Physiology of the eye*. Dans: Veterinary Ophthalmology, 3<sup>th</sup> ed. (Gelatt KN ed); Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphie 1999: p.151-181.

Golub LM, Ramamurthy NS, McNamara TF, Greenwald RA, Rifkin BR. *Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs*. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine 1991; 2(3): p.297-321.

Gordon MK, Foley JW, Birk DE, Fitch JM & Linsenmayer TF. *Type V collagen and Bowman's membrane. Quantitation of mRNA in corneal epithelium and stroma*. Journal of Biological Chemistry 1994; 269 (40): p.2459-2466.

Gratzek AT, Kaswan RL, Martin CL, Champagne ES, White SL. *Ophthalmic cyclosporine in equine keratitis and keratouveitis: 11 cases*. Equine Veterinary Journal 1995; 27 (5): p.327-333.

Gregory CR, Hietala SK, Pedersen NC, Gregory TA, Floyd-Hawkins KA, Patz JD. *Cyclosporine pharmacokinetics in cats following topical ocular administration*. Transplantation 1989; 47 (3): p.516-519.

Gross J, Lapierre CM. *Collagenolytic activity in amphibian tissue: a tissue culture assay*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 1962; 48: p.1014-1022

Gross J. Dans: Cell biology of extracellular matrix (Hay ED ed). Plenum, New York 1981: p.217-258.

Haffner JC, Fecteau KA, Eiler H. *Inhibition of collagenase breakdown of equine corneas by tetanus antitoxin, equine serum and acetylcysteine*. Veterinary Ophthalmology 2003; 6(1): p.67-72.

Harbin T. *Recurrence of corneal Pseudomonas infection after topical steroid therapy: report of a case*. American Journal of Ophthalmology 1964; 58: p. 670-674.

Havener WH. *Ocular pharmacology* 4<sup>ième</sup> ed, St-Louis, CV Mosby 1978: p.19-26, 539-540, 570.

Havener WH. *Ocular pharmacology*, 5<sup>th</sup> ed. St-Louis; Mosby, Toronto 1983: p.433-500.

Heussen C, Dowdle EB. *Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates*. Analytical Biochemistry 1980; 102 (1): p.196-202.

Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE. *Histology of the human eye: an atlas and textbook*. Philadelphia ; Saunders, Toronto : 1971, 687 pages.

Holly FJ, Lamberts DW. *Effect of nonisotonic solutions on tear film osmolality*. Investigative Ophthalmology & Visual Science 1981; 20 (2): p.236-245.

Holly FJ, Lemp MA. *Tear physiology and dry eyes*. Survey of Ophthalmology 1977; 22 (2): p.69-87

Hyndiuk RA. *Experimental pseudomonas keratitis*. Transaction of American Ophthalmology Society 1981; 79: p. 540-624.

Hyndiuk RA, Eiferman RA, Caldwell DR, Rosenwasser GO, Santos CI, Katz HR, Badrinath SS, Reddy MK, Adenis JP, Klauss V. *Comparison of ciprofloxacin ophthalmic solution 0.3% to fortified tobramycin-cefazolin in treating bacterial corneal ulcers*. Ciprofloxacin Bacterial Keratitis Study Group. Ophthalmology 1996; 103 (11): p.1854-1862.

Itoi M, Gnadinger MC, Slansky HH, Freeman MI, Dohlman CH. *Collagenase in the cornea*. Experimental Eye Research 1969; 8 (3): p. 369-373.

Jakus MA. *Studies on the cornea. II. The fine structure of Descemet's membrane*. Journal of Biophysical, Biochemistry and Cytology 1956; 2 (4, Suppl.): p.243-252.

Jones BR, Coop HV. *The management of keratoconjunctivitis sicca*. Transactions of the Ophthalmological societies of the United Kingdom 1965; 85: p.379-390.

Kessler E, Kennah HE, Brown SI. *Pseudomonas protease. Purification, partial characterization, and its effect on collagen, proteoglycan, and rabbit corneas*. Investigative Ophthalmology & Visual Science 1977; 16 (6): p.488-497.

Khodadoust AA, Silverstein AM, Kenyon DR, Dowling JE. *Adhesion of regenerating corneal epithelium*. American Journal of Ophthalmology 1968; 65 (3): p.339-348.

Kruit PJ. *Cyclosporine A treatment in four cases with corneal melting syndrome.* Transplantation Proceedings 1988; 20: p.170-172.

Kumagai N, Yamamoto K, Fukuda K, Nakamura Y, Fujitsu Y, Nuno Y, Nishida T. *Active matrix metalloproteinases in the tear fluid of individuals with vernal keratoconjunctivitis.* Journal of Allergy and Clinical Immunology 2002; 110 (3): p.489-491.

Lee VHL, Robinson JR. *Topical ocular drug delivery: recent developments and future challenges.* Journal of Ocular Pharmacology 1986; 2 (1): p. 67-108.

Leonardi A, Brun P, Abatangelo G, Plebani M, Secchi AG. *Tear levels and activity of matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 in vernal keratoconjunctivitis.* Investigative Ophthalmology & Visual Science 2003; 44 (7): p.3052-3058.

Li DQ, Lokeshwar BL, Solomon A, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC. *Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells.* Experimental Eye Research 2001; 73 (4): p.449-459.

Lust G, Williams AJ, Burton-Wurster N, Beck KA, Rubin G. *Effects of intramuscular administration of glycosaminoglycan polysulfates on signs of incipient hip dysplasia in growing pups.* American Journal of Veterinary Research 1992; 53 (10): p.1836-1843.

Ma Joseph JK, Dohlman CH. *Mechanisms of corneal ulceration.* Ophthalmology Clinics of North America 2002;15 (1): p.27-33.

Maidment DC, Kidder DE, Taylor MN. *Electrolyte and protein levels in bovine tears.* British Veterinary Journal 1985; 141 (2): p.169-173.

Martin CL. *Effect of topical vitamin A, antibiotic, mineral oil, and subconjunctival corticosteroid on corneal epithelial wound healing in the dog.* Journal of American Veterinary Medical Association 1971; 159 (11): p.1392-1399.

Martin CL, Munnell J, Kaswan R. *Normal ultrastructure and histochemical characteristics of canine lacrimal glands.* American Journal of Veterinary Research 1988; 49 (9): p.1566-1572.

Mathews AG. *Cyclosporine A and the equine cornea.* Equine Veterinary Journal 1995; 27 (5): p.320-321.

Mathis GA. *Ocular drug delivery.* Dans: *Clinical Ophthalmic Pharmacology and Therapeutics.* Dans: *Veterinary Ophthalmology* 3<sup>th</sup> ed. (Gelatt KN ed); Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphie 1999: p.291-297.

Matsubara M, Zieske JD, Fini ME. *Mechanism of basement membrane dissolution preceding corneal ulceration.* Investigative Ophthalmology & Visual Science 1991; 32 (13): p.3221-3237.

Matsuda H et Smelser GK. *Epithelium and stroma in alkali-burned corneas.* Archives of Ophthalmology 1973; 89 (5): p.396-401.

Mawas J. *L'innervation de la cornée humaine.* Bulletin de la Société d'Ophtalmologie Française 1951; 2: p.162-168.

McDonald PJ, Watson AD. *Microbial flora of normal canine conjunctivae.* Journal of Small Animal Practice 1976, 17 (12); 809-812.

McGee DW, Franklin RM. *Lymphocyte migration into the lacrimal gland is random.* Cellular Immunology 1984; 86 (1): p.75-82.

Miller WW. *Using polysulfated glycosaminoglycans to treat persistent corneal erosion in dogs.* Veterinary Medicine 1996; 91: p.916-922.

Mindel JS. *Pharmacokinetics.* Dans: Duane's Foundation of Clinical Ophthalmology, vol. 3. (Tasman W, Jaeger EA eds); Philadelphie, JB Lippincott 1995: p.1-23.

Mircheff AK. *Lacrimal fluid and electrolytes secretion: a review.* Current Eye Research 1989; 8 (6): p.607-617.

Mishima S. *Some physiological aspects of the precorneal tear film.* Archives of Ophthalmology 1965; 73: p.233-241.

Miyajima S, Akaike T, Matsumoto K, Okamoto T, Yoshitake J, Hayashida K, Negi A, Maeda H. *Matrix metalloproteinases induction by pseudomonas virulence factors and inflammatory cytokines in vitro.* Microbial Pathogenesis 2001; 31 (6): p.271-281.

Mochizuki M, De Smet M. *Use of immunosuppressive agents in ocular diseases.* Progress in Retinal and Eye Research 1994; 13 (2): p. 479-506.

Mondino BJ, Pleyer U. *Chap. 45: Host defense against bacterial and fungus disease.* Dans: Duane's Foundation of Clinical Ophthalmology, vol. 2. (Tasman W, Jaeger EA eds); Philadelphie, JB Lippincott, 1995: p1-7.

Montgomery PC, Peppard JV, Skandera CA. *A comparison of lymphocyte subset distribution in rat lacrimal glands with cells from tissues of mucosal and non-mucosal origin.* Current Eye Research 1990; 9 (1): p.85-93

Moore CP. *Diseases and surgery of the lacrimal secretory system.* Dans: Veterinary Ophthalmology, 3<sup>th</sup> ed. (Gelatt KN ed). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphie 1999: p.583-607.

Murphy G, Cockett MI, Ward RV, Docherty AJ. *Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP).* Biochemistry Journal 1991; 277 (Pt 1): p.277-279.

Murphy G, Ward R, Hembry RM, Reynolds JJ, Kuhn K, Tryggvason K. *Characterization of gelatinase from pig polymorphonuclear leucocytes. A metalloproteinase resembling tumour type IV collagenase.* Biochemistry Journal 1989; 258 (2): p.463-472.

Nagase H. *Human stromelysins 1 and 2.* Methods in Enzymology 1995; 248: p.449-470.

Nagase H. *Activation mechanisms of matrix metalloproteinases.* Journal of Biology and Chemistry 1997; 378: p.151-160.

Nagase H, Okada Y. *Chap 21: Proteinases and Matrix Degradation.* Dans: Textbook of Rheumatology, 5<sup>th</sup> ed. (Kelley WN et al. eds); Philadelphie, W.B. Saunders Compagny 1997: p.323-338.

Nagase H, Woessner Jr JF. *Matrix metalloproteinases.* Journal of Biological and Chemistry 1999; 274 (31): p.21491-21494.



Nakamura M, Kobayashi M, Hirano K, Kobayashi K, Hoshino T, Awaya S. *Glycosaminoglycan and collagen fibrillar interactions in the mouse corneal stroma*. Matrix Biology; 1994; 14 (4): p.283-286.

Nakamura Y, Sotozono C, Kinoshita S. *Inflammatory cytokines in normal human tears*. Current Eye Research 1998; 17 (6): p.673-676.

Nasissie MP. *Canine ulcerative keratitis*. Dans: Ophthalmology in Small Animal Practice. The Compendium Collection. Veterinary learning systems, Trenton, NJ; 1996: p.45-59.

Ng V, Cho P, Mak S, Lee A. *Variability of tear protein levels in normal young adults: between-day variation*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology 2000; 238 (11): p.892-899.

Ollivier FJ, Brooks DE, Kallberg ME, Komaromy AM, Lassaline ME, Andrew SE, Gelatt KN, Stevens GR, Blalock TD, van Setten GB, Schultz GS. *Evaluation of various compounds to inhibit activity of matrix metalloproteinases in the tear film of horses with ulcerative keratitis*. American Journal of Veterinary Research 2003; 64 (9) p.1081-1087.

Pandit JC, Nagyova B, Bron AJ, Tiffany JM. *Physical Properties of Stimulated and Unstimulated Tears*. Experimental Eye Research 1999; 68 (2): p.247-253.

Parks WC, Sudbeck BD et al. *Matrix metalloproteinases in tissue repair*. Dans: Matrix metalloproteinases (Parks WC, Mecham RP eds). Academic Press, San Diego 1998: p.263-290.

Peiffer RL, Wilcock BP, Dubielzig RR, Render, JA, Whiteley HE. *Fundamentals of veterinary ophthalmic pathology*. Dans: *Veterinary Ophthalmology*, 3<sup>th</sup> ed. (Gelatt KN ed.); Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphie 1999: p.355-425.

Petroutsos G, Guimaraes R, Giraud JP, Renard G, Pouliquen Y. *Effect of acetylcysteine (Mucomyst) on epithelial wound healing*. *Ophthalmic Research* 1982; 14 (4): p.241-248.

Pfister RR. *Chemical corneal burns*. *International Ophthalmology Clinics* 1984; 24 (2): p.157-168.

Pineda-Bolivar F, Garcia-Sanchez GA, Franco-Bourland R, Brooks DE. *Evaluation of tear film metalloproteinases in normal dogs and in dogs with ulcerative keratitis* (abstract). *Proceeding of International Society of Veterinary Ophthalmology* 2001: p.13.

Poon AC, Geerling G, Dart JK, Fraenkel GE, Daniels JT. *Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies*. *British Journal of Ophthalmology* 2001; 85(10): p.1188-97.

Ratnikov, B, Deryugina E, Leng J, Marchenko G, Dembrow D, Strongin A. *Determination of Matrix Metalloproteinase Activity using Biotinylated Gelatin*. *Analytical Biochemistry* 2000; 286 (1): p.149-155.

Records R. *Chap 3: The tear film*. Dans: *Duane's Foundation of Clinical Ophthalmology*, vol. 2 (Tasman W, Jaeger EA eds); Philadelphie, JB Lippincott 1995: p.1-10.

Regnier A. *Antimicrobials, anti-inflammatory agents, and antiglaucoma drugs*. Dans: *Clinical ophthalmic pharmacology and therapeutics*, Dans: *Veterinary Ophthalmology* 3<sup>th</sup> ed. (Gelatt KN ed); Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphie 1999: p.297-336.

Robert PY, Tassy A. *Biodisponibilité des antibiotiques*. Journal Français d'Ophthalmologie 2000; 23: p.510-513.

Roberts SR, Erickson OF. *Dog tear secretion and tear proteins*. Journal of Small Animal Practice 1962; 3: p.1-6.

Ryffel B, Donatsch P, Madorin M, Matter BE, Ruttimann G, Schon H, Stoll R, Wilson J. *Toxicological evaluation of cyclosporin A*. Archives of Toxicology 1983; 53: p.107-141.

Sakimoto T, Shoji J, Sawa M. *Active form of gelatinases in tear fluid in patients with corneal ulcer or ocular burn*. Japanese Journal of Ophthalmology 2003; 47 (5): p.423-426.

Salonen EM, Tervo T, Torma E, Tarkkanen A, Vaheri A. *Plasmin in tear fluid of patients with corneal ulcers: basis for new therapy*. Acta Ophthalmologica (Copenh) 1987; 65 (1): p.3-12.

Samuelson D.A. *Ophthalmic anatomy*. Dans: Veterinary Ophthalmology, 3<sup>th</sup> ed. (Gelatt KN ed); Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphie 1999: p31-150.

Scheiffarth OF, Stefani FH, Gabriel N, Lund OE. *T lymphocytes of the normal human cornea*. British Journal of Ophthalmology 1987; 71(5): p.384-386.

Schultz CL, Morck DW, McKay SG, Olson ME, Buret A. *Lipopolysaccharide induced acute red eye and corneal ulcers*. Experimental Eye Research 1997; 64 (1): p.3-9.

Schultz GS. *Modulation of corneal wound healing*. Dans: Cornea (Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ eds) St-Louis: Mosby Year Book Inc 1997: p.183-196.

Schultz GS, Strelow S, Stern GA, Chegini N, Grant MB, Galardy RE, Grobelny D, Rowsey JJ, Stonecipher K, Parmley V, et al. *Treatment of alkali-injured rabbit corneas with a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases*. Investigative Ophthalmology & Visual Science 1992; 33 (12): p.3325-3331.

Sherrard E. *The cornea: structure and transparency*. Dans: Scientific Foundation of Ophthalmology: Year Book Medical, (Perkins ES, Hill DW eds); Chicago 1977: p.29-35.

Sitaramamma T, Shivaji S, Rao GN. *Effect of storage on protein concentration of tear samples*. Current Eye Research 1998; 17(10): p.1027-35.

Sivak JM, Fini ME. *MMPs in the eye: emerging roles of matrix metalloproteinases in ocular physiology*. Progress in Retinal and Eye Research 2002; 21(1): p.1-14.

Slansky HH, Berman MB, Dohlman CH, Rose J. *Cysteine and acetylcysteine in the prevention of corneal ulceration*. Annual Ophthalmology 1970; 2: p.488-493.

Slansky HH, Gnadinger MC, Itoi M, Dohlman CH. *Collagenase in corneal ulcerations*. Archives of Ophthalmology 1969; 82 (1): p.108-11.

Smith GN Jr, Mickler EA, Hasty KA, Brandt KD. *Specificity of inhibition of matrix metalloproteinase activity by doxycycline: relationship to structure of the enzyme*. Arthritis & Rheumatism 1999; 42(6): p.1140-1146.

Smith VA, Hoh HB, Easty DL. *Role of ocular matrix metalloproteinases in peripheral ulcerative keratitis*. British Journal of Ophthalmology 1999; 83 (12): p.1376-1383.

Smith VA, Hoh HB, Littleton M, Easty DL. *Over-expression of a gelatinase A activity in keratoconus*. Eye 1995; 9 (Pt 4): p.429-433.

Smith VA, Rishmawi H, Hussein H, Easty DL. *Tear film MMP accumulation and corneal disease*. British Journal of Ophthalmology 2001; 85 (2): p.147-153.

Smolek MK, Klyce S. *Cornea*. Dans: Biomedical Foundations of Ophthalmology, vol. 1. (Tasman W, Jaeger EA eds); Philadelphie, JB Lippincott 1993: p.1-20

Smolin G, Friedlaender MH. *Chap. 26: Immunology of ocular tissues*. Dans: Duane's Foundation of Clinical Ophthalmology, vol. 2. (Tasman W, Jaeger EA, eds); Philadelphie, JB Lippincott 1995: p.1-5.

Sobrin L, Liu Z, Monroy DC, Solomon A, Selzer MG, Lokeshwar BL, Pflugfelder SC. *Regulation of MMP-9 activity in human tear fluid and corneal epithelial culture supernatant*. Investigative Ophthalmology and Visual Science 2000; 41 (7): p.1703-1709.

Solomon A, Rosenblatt M, Li DQ, Liu Z, Monroy D, Ji Z, Lokeshwar BL, Pflugfelder SC. *Doxycycline inhibition of interleukine-1 in the corneal epithelium*. Investigative Ophthalmology & Visual Science 2000; 41 (9): p.2544-2557.

Spiess BM, Mathis GA, Franson KL, Leber A. *Kinetics of uptake and effects of topical indomethacin application on protein concentration in the aqueous humor of dogs*. American Journal of Veterinary Research 1991; 52 (7): p.1159-1163.

Stern GA, Lubniewski A, Allen C. *The interaction between Pseudomonas aeruginosa and the corneal epithelium. An electron microscopic study*. Archives of Ophthalmology 1985; 103 (8): p.1221-1225.

Stern GA, Schultz GS. *Chapitre 42: The pathogenesis of bacterial infections of the cornea.* Dans: Duane's Foundation of Clinical Ophthalmology, vol. 2. (Tasman W, Jaeger EA eds); Philadelphie, JB Lippincott 1995: p1-11.

Strubbe DT, Brooks DE, Schultz GS, Willis-Goulet H, Gelatt KN, Andrew SE, Kallberg ME, MacKay EO, Collante WR. *Evaluation of tear film proteinases in horses with ulcerative keratitis.* Veterinary Ophthalmology 2000; 3 (2-3): p.111-119.

Swan KC, White NG. *Corneal permeability: I. Factors affecting penetration of drugs into the cornea.* American Journal of Ophthalmology 1942; 25: p. 1043.

Takahashi T, Cho, HI., Kublin, CI., Cintron, C. *Keratan sulfate and dermatan sulfate proteoglycans associated with type IV collagen in fetal rabbit cornea.* Journal of Histochemistry and Cytochemistry 1993; 41: p.1447-1457.

Tamura Y, Konomi H, Sawada H, Takashima S, Nakajima A. *Tissue distribution of type VIII collagen in human adult and fetal eyes.* Investigative Ophthalmology & Visual Science 1991; 32 (9): p.2636-2644.

Tang-Liu DD, Richman JB, Liu SS. *Lenticular uptake and distribution of xenobiotics and amino acids.* Journal of Ocular Pharmacology 1992; 8 (3): p.267-277.

Tao Y., Bazan HEP, Bazan NG. *Platelet-Activating factor induces the expression of metalloproteinases-1 and -9 but not -2 or -3, in the corneal epithelium.* Investigative Ophthalmology & Visual Science 1995; 36 (2): p.345-354.

Thermes F, Molon-Noblot S, Grove J. *Effects of acetylcysteine on rabbit conjunctival and corneal surfaces. A scanning electron microscopy study.* Investigative Ophthalmology & Visual Science 1991; 32 (11): p.2958-2963.

Tsubota K, Goto E, Shimmura S, Shimazaki J. *Treatment of persistent epithelial defect by autologous serum application.* Ophthalmology 1999;106 (10) : p.1984-1989.

Twining SS. *Regulation of proteolytic activity in tissues.* Crit Rev Biochem Mol Biol 1994;29 (5): p.315-383.

Twining SS, Fukuchi T, Yue BY, Wilson PM, Zhou X, Loushin G. *Alpha 2-macroglobulin is present in and synthesized by the cornea.* Investigative Ophthalmology & Visual Science 1994; 35 (8): p3226-3233.

Vantrappen L, Geboes K, Missotten L, Maudgal PC, Desmet V. *Lymphocytes and langerhans cells in the normal human cornea.* Investigative Ophthalmology & Visual Science 1985; 26 (2): p.220-225.

Vu TH, Werb Z. *Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology.* Genes & development 2000; 14 (17): p.2123–2133.

Ward DA. *Ocular pharmacology.* Dans: Veterinary Ophthalmology 3<sup>th</sup> ed. (Gelatt KN ed); Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphie 1999: p.336-354.

Ward DA, Clark ES. *Ocular pharmacology.* Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice 1991; 7 (3): p.779-791.

Watsky MA, Olsen TW, Edelhauser HF. *Cornea and sclera*. Dans: Duane's Foundation of Clinical Ophthalmology, vol. 2. (Tasman W, Jaeger EA eds); Philadelphie, JB Lippincott 1995: p.1-29.

Weller CA, Brown S. *Dynamics of collagenase inhibition*. American Journal of Ophthalmology 1970; 70; p. 744.

Wentworth JS, Paterson CA, Gray RD. *Effect of a metalloproteinase inhibitor on established corneal ulcers after an alkali burn*. Investigative Ophthalmology & Visual Science 1992; 33 (7): p.2174-2179.

Werb Z. *ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology*. Cell 1997; 91 (4): p.439-442.

Whitley DR, Gilger BC. *Diseases of the canine cornea and sclera*. Dans: Veterinary Ophthalmology, 3<sup>th</sup> ed. (Gelatt KN ed); Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphie 1999: p.635-673.

Wilkie DA, Whittaker C. *Surgery of the cornea*. Dans: The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice (Nasisse MP ed). 1997; 27 (5): p.1067-1108.

Willeford KO, Miller WW, Abrams KL, Vaughn BM. *Modulation of proteolytic activity associated with persistent corneal ulcers in dogs*. Veterinary Ophthalmology 1998; 1 (1): p.5-8.



Wilson SE, He YG, Weng J, Li Q, McDowall AW, Vital M, Chwang EL. *Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing*. *Experimental Eye Research* 1996; 62 (4): p.325-327.

Woessner JF. *The matrix metalloproteinase family*. Dans: *Matrix metalloproteinases* (Parks WC, Mecham RP eds); Academic Press, San Diego 1998: p.1-13.

Woessner JF Jr. *Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling*. *FASEB journal* 1991; 5 (8); p.2145-2154.

Wong TT, Sethi C, Daniels JT, Limb GA, Murphy G, Khaw PT. *Matrix metalloproteinases in disease and repair processes in the anterior segment*. *Survey of Ophthalmology* 2002; 47(3): p.239-256.

Woodley DT, Kalebec T, Banes AJ, Link W, Prunieras M, Liotta L. *Adult human keratinocytes migrating over nonviable dermal collagen produce collagenolytic enzymes that degrade type I and type IV collagen*. *Journal of Investigative Dermatology* 1986; 86 (4): p.418-423.

Yanoff M et Duker JS. *Ophthalmology 2nd ed*, St-Louis, Mosby edition, 2004. 1417 p.

Ye HQ, Azar DT. *Expression of gelatinases A and B, and TIMPs 1 and 2 during corneal wound healing*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1998; 39 (6): p.913-921.

Yu AE, Murphy AN, et al. *Gelatinase (Gelatinase A): structure, activation, regulation and substrate specificity*. Dans: *Matrix metalloproteinases* (Parks WC, Mecham RP eds); Academic Press, San Diego 1998: p. 85-113.

Zhan Q, Burrows R, Cintron C. *Localization of type XII collagen in normal and healing rabbit cornea by in situ hybridization.* Experimental Eye Research 1995; 60 (5): p.551-561.



# ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE<sup>1</sup>

## IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

<b>Nom de l'étudiant</b> COUTURE Simon		<b>Code permanent</b> [REDACTED]
<b>Sigle du programme</b> M.Sc.	<b>Titre du programme</b> Sciences vétérinaires	<b>Option</b> Sciences cliniques

## DESCRIPTION DE L'ARTICLE

<b>Auteurs</b> COUTURE Simon ; CARRIER Michel ; DOUCET Michèle ; MOREAU Maxime	
<b>Titre</b> Topical effect of various agents on matrix metalloproteinases 2 and 9 activity in the tear film of normal dogs.	
<b>Revue</b> Veterinary Ophthalmology	<b>Date de publication</b> Inconnue

## DÉCLARATION DES COAUTEURS

<b>Déclaration</b>		
À titre de coauteurs de l'article identifié ci-dessus, nous autorisons le microfilmage du mémoire et nous sommes d'accord que <i>Simon Couture</i> inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre <i>Effet de divers agents en application locale sur la concentration des métalloprotéinases 2 et 9 dans le film de larmes canin normal.</i>		
<b>Coauteur</b> Michel Carrier	[REDACTED]	<b>Date</b> 09/05/2005
<b>Coauteur</b> Michèle Doucet	[REDACTED]	<b>Date</b> 09/05/2005
<b>Coauteur</b> Maxime Moreau	[REDACTED]	<b>Date</b> 10/05/2005
<b>Coauteur</b>	[REDACTED]	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>

<sup>1</sup>Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001