

Évaluation clinique d'un traitement local combiné dans un modèle murin de lymphome oculaire primitif de phénotype B

Evaluation of a combined and local immunotherapy in an immunocompetent mouse model of primary intraocular lymphoma

G Besombes [1], E Bohere [1], L Nouvel [1], C Karkoutly [1], J-F Rouland [1], M Labalette [2], J-P Dessaint [2], P Labalette [1]

1. Ophthalmologie, CHRU de Lille, Université Lille 2, France

2. Immunologie, CHRU de Lille, EA2686, Université Lille 2, France

Mots clés

- ◆ Oncologie oculaire
- ◆ Imagerie
- ◆ Lymphome
- ◆ Murin
- ◆ Fond d'œil
- ◆ Classification

Résumé

Le lymphome primitif intra-oculaire (LPIO) de type B est une tumeur agressive rare pour laquelle les traitements restent limités avec une morbidité notable. L'immunothérapie par anticorps monoclonal anti-CD20 (rituximab) a nettement amélioré le pronostic des lymphomes B non-hodgkiniens systémiques mais, administrée par voie générale (intraveineuse), elle est peu efficace sur le LPIO car la barrière hématorétinienne limite sa diffusion intra-oculaire. Ce traitement est cependant actif par voie vitréenne mais nécessite alors l'injection de volumes et de doses importants.

Pour limiter le volume injecté dans le vitré, nous avons montré l'intérêt de combiner l'injection d'une faible dose d'anticorps anti-CD20 et de sérum, source de complément, dans notre modèle murin de lymphome oculaire, celui-ci n'étant naturellement présent dans l'œil qu'en faible quantité.

Afin d'affiner l'analyse des lésions lymphomateuses chez nos souris, nous avons amélioré notre technique d'imagerie et réalisé des angiographies rétinienne à la fluorescéine, permettant ainsi l'élaboration d'une classification clinique de l'infiltrat vitréo-rétinien.

Nos résultats soulignent la potentialisation de l'effet thérapeutique du rituximab lors d'une injection simultanée de complément et l'intérêt d'une démarche similaire en clinique humaine.

Keywords

- ◆ Oncology
- ◆ Imaging
- ◆ Lymphoma
- ◆ Retina
- ◆ Grading system

Abstract

Primary intraocular lymphoma (PIOL) is an aggressive tumor. Standard treatment still remains limited with much morbidity. The chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) has greatly improved the prognosis of diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphomas but is not effective on PIOL partly because the blood retina barrier limits the antibody crossing. Moreover, the low density of complement proteins in CNS and eye prevents one of the most efficient rituximab mechanisms of action: the complement dependent cytotoxicity.

In vivo, 38C13CD20+ cells were inoculated in the vitreous of immunocompetent syngeneic mice. Then rituximab associated with serum was locally injected, and compared to local injections of rituximab alone (with different concentrations). Exophthalmos was monitored. We have created a new classification of the lymphoma's retinal involvement from the fundus of mice, in order to monitor precisely the effects of the therapeutics injected. A new application of the retinal angiography for mice was performed, standing for a new diagnosis tool.

In vivo, rituximab and serum injected together have decreased exophthalmos incidence. Thus, intraocular rituximab with serum injections are effective on eye involvement. These results encourage designing human clinical trials including local injections of rituximab and autologous serum, providing complement.

Le lymphome primitif intra-oculaire (LPIO) est une tumeur agressive rare dont le diagnostic est rendu difficile du fait de la variété des présentations cliniques.

Il représente 1 à 2 % des lymphomes non-hodgkiniens extra-nodaux (1). Son incidence était de 10 cas/MH/an en 2002 (2, 3) ; elle est en augmentation depuis 30 ans de par la forte incidence des lymphomes primitifs du système nerveux central (LPSNC) (4). Lors du diagnostic de LPSNC, il existe d'emblée 10 à 25 % d'envahissement intra-oculaire (2-5) et 80 % des patients porteurs de LPIO vont développer une atteinte du

système nerveux central (3, 4) dans une moyenne de 29 mois (6).

Les localisations possibles de l'atteinte oculaire sont le vitré, la rétine et le nerf optique.

Sur le plan microscopique, les LPSNC sont dans 90 à 97 % des cas des lymphomes non-hodgkinien diffus à grandes cellules de type B exprimant le CD20 (2-5, 7).

La présence de multiples infiltrations situées sous l'épithélium pigmentaire est considérée comme pathognomonique de la pathologie. Les nodules tumoraux sont comme pour le cer-

Correspondance :

Guillaume Besombes

Service d'Ophthalmologie, Hopital Huriez, rue Michel Polonowski, 59037 Lille Cedex

E-mail : guillaume@besombes.fr

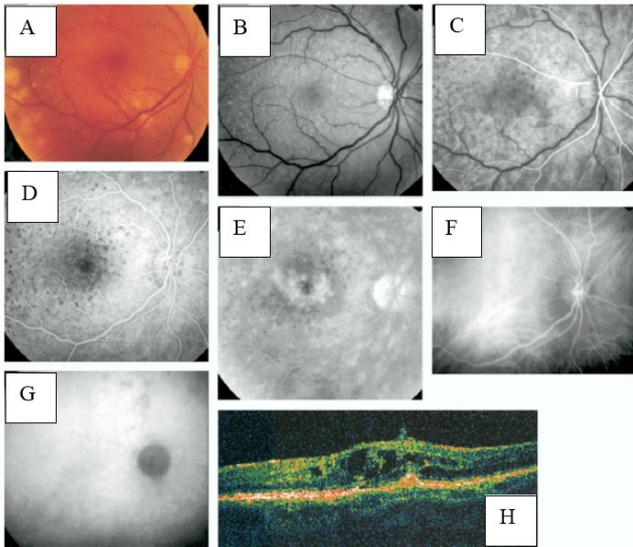


Figure 1. D'après [11]. Femme de 68 ans avec LPIO avéré.
 A : lésions nodulaires rétiniennes profondes jaunes orangées typiques.
 B : cliché anérythre : lésions multiples blanchâtres sur le pôle postérieur, périmaculaires.
 C, D, E : angiographie fluorescéinique temps précoce et tardifs ; lésions hypofluorescentes persistantes.
 F, G : angiographie au vert d'indocyanine : quelques lésions hypofluorescentes persistantes au temps tardif.
 H : OCT (Tomographie à cohérence Optique, coupe horizontale maculaire) : œdème maculaire cystoïde et lésions hyperréfléctives au niveau de l'épithélium pigmentaire rétinien.

veau, plus fréquents et plus denses en périvasculaire et peuvent être situés dans la neurorétine ou en sous rétiniens, et entre la membrane de Bruch et l'épithélium pigmentaire. Il existe fréquemment un développement tumoral intravitréen qui peut être isolé (2, 5). Le LPIO respecte en règle la choroïde alors que les lymphomes choroïdiens primitifs et lymphomes systémiques secondairement localisés à l'œil l'envahissent (4).

La clinique est très polymorphe et trompeuse pour le LPIO, ce qui explique un délai entre les premiers symptômes et le diagnostic de 6 à 21 mois (1). L'atteinte est en règle unilatérale à la phase initiale (bien qu'elle puisse être bilatérale d'emblée) puis dans 80 à 90 % des cas, une bilatéralisation apparaît au cours de l'évolution (1, 2). Les signes fonctionnels sont : un flou visuel, des myodésopsies, des douleurs (rares) et une rougeur oculaire, ou surtout chez le sujet âgé, un aspect d'uvéïte chronique résistante aux corticoïdes (1, 4, 5). Dans 20 % des cas, le LPIO est asymptomatique (5).

L'anomalie la plus fréquente lors de l'examen ophtalmologique est une infiltration cellulaire diffuse ou en amas cellulaire pouvant donner un aspect « brumeux » avec éventuellement signe de Tyndall postérieur correspondant à un aspect de hyalite.

La présence d'infiltrations multiples sous-rétiniennes profondes, d'aspect jaune orangé, est très en faveur du diagnostic (fig. 1, cliché A). On peut parfois également observer des masses rétiniennes profondes isolées, des hémorragies rétiniennes, des décollements de rétine exsudatifs ou des neuropathies optiques. L'atteinte de la chambre antérieure est rare, on peut observer des précipités rétrocornéens, un Tyndall protéique ou cellulaire et plus rarement des néovaisseaux iriens ou de l'angle irido-cornéen pouvant se compliquer de glaucome (1, 2, 4, 5).

L'angiographie à la fluorescéine retrouve fréquemment des lésions hypofluorescentes ponctiformes dès le temps précoce, qui perdurent aux temps tardifs, soulignant l'effet masque de la fluorescence choroïdienne (fig. 1, clichés C, D et E). Cet aspect correspond aux infiltrats visibles au fond d'œil, particulièrement sur les clichés anérythres (fig. 1, cliché B).

L'angiographie au vert d'indocyanine (fig. 1, clichés F et G)

est moins contributive pour le diagnostic de LPIO puisque l'on ne retrouve que peu, ou pas, de zones hypofluorescentes comparées aux lésions ponctiformes du fond d'œil (effet masque moindre du fait des propriétés d'absorption et de fluorescence dans l'infrarouge du vert d'indocyanine).

L'examen par tomographie à cohérence optique (OCT) retrouve des lésions hyperréfléctives nodulaires de l'épithélium pigmenté rétinien (fig. 1, cliché H).

Les thérapeutiques comprennent la radiothérapie, la chimiothérapie systémique ou intrathécalle, et des traitements adjuvants comme les corticoïdes et l'immunothérapie. La radiothérapie est le traitement de référence historique, mais il est associé à un fort taux de complications et une tolérance médiocre, surtout chez le sujet âgé. Concernant la chimiothérapie pour le LPIO et LPSNC, le méthotrexate intrathécalle ou intravitréen est décrit comme le traitement de première intention, et son administration par voie systémique repose sur des critères de taille tumorale ou sur le caractère réfractaire du lymphome (8-12).

Le pronostic s'est considérablement amélioré ces dernières années avec la réalisation de chimiothérapie seule ou associée à la radiothérapie. Mais les récurrences sont fréquentes (50 % pour le LPIO (1)) et la médiane de survie courte : elle est estimée sous traitement à 12 mois pour le LPSNC (7) et moins de 25 % des patients présentant un LPIO sont encore en vie à 5 ans (4).

Le caractère diffus de l'atteinte, associé au mauvais pronostic du traitement habituel, a ouvert la voie à de nouvelles thérapeutiques, dont l'immunothérapie.

L'utilisation de l'anticorps anti-CD20 (rituximab : Mabthera®, Rituxan®) dans les lymphomes malins non-hodgkiniens systémiques en a nettement amélioré le pronostic (13).

Il s'agit d'un anticorps monoclonal chimérique composé d'une immunoglobuline G1 humaine (correspondant aux régions constantes) et de régions variables murines (14). Il est dirigé spécifiquement contre le récepteur CD20 humain.

L'efficacité du rituximab est expliquée par plusieurs mécanismes d'action (13) :

- une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante de l'anticorps. Le fragment Fc de l'anticorps se lie au récepteur Fc exprimé par les cellules accessoires (monocytes, macrophages et cellules NK) ;
- une cytotoxicité directe médiée par le complément : la liaison du composé C1q à l'anticorps (fragment Fc) initie la voie classique du complément, conduisant à la formation de complexes d'attaque membranaire et ainsi à la lyse de la cellule tumorale (15) ;
- une induction d'apoptose, par l'intermédiaire de la voie mitochondriale (cytochrome C).

La réalisation d'injections locales est logique dans les cas de LPSNC et de LPIO car les barrières hémato-méningée et hématorétinienne limitent le passage des anticorps dans le LCS et le vitré. En effet, après injection intraveineuse de rituximab, sa concentration dans le LCS est 500 à 1 000 fois moins importante que celle du plasma (11), de l'ordre de 0,1 % (16).

Un modèle murin immunocompétent syngénique d'une lignée lymphomateuse B transfectée au CD20 humain a été validé au cours des travaux de recherche antérieurs. Des injections tumorales intracérébrales, intra-oculaires et intraventriculaires ont permis le développement de lésions histologiquement très proches de celles observées chez l'homme. L'efficacité du rituximab en injections locales a été démontrée par une augmentation de la survie pour le LPSNC et une diminution d'incidence des exophtalmies pour le LPIO (17).

Cependant, ce traitement qui a montré son efficacité par voie locale intravitréenne, nécessite l'injection de volumes et de doses importants, limitant son application en clinique humaine.

Ainsi, pour limiter le volume injecté dans le vitré, nous avons choisi d'évaluer la potentialisation de la cytotoxicité du rituximab par l'injection intra-oculaire concomitante de com-

plément, d'autant qu'il s'agit de molécules solubles (capables de pénétrer aisément dans la tumeur). De plus, certains composés du complément sont présents dans l'œil humain et activés à taux faible de façon chronique en l'absence de pathologie.

En parallèle, nous avons cherché à affiner l'analyse des lésions intra-oculaires de LPIO chez notre modèle murin et effectuer des clichés répétés du fond d'œil. En réalisant des clichés standardisés au long de l'évolution clinique, nous avons souhaité élaborer une classification clinique de l'infiltrat vitréorétinien, afin d'étalonner l'évolution naturelle de la maladie et d'évaluer l'effet des traitements administrés. Nous avons également réalisé des angiographies rétiniennees à la fluorescéine chez nos souris pour rechercher des lésions évocatrices de lymphome similaires à celles rencontrées en pathologie humaine.

Enfin, les résultats de nos travaux préliminaires (17) semblant montrer que l'injection locale d'oligodésoxynucléotides (ODN) constitue une immunothérapie alternative intéressante, nous avons cherché à savoir si leur récepteur cellulaire spécifique (le *Toll-Like Receptor 9* ou TLR9) était exprimé dans les tissus oculaires. Nous avons défini les protocoles de fixation et déterminé la dilution optimale des anticorps utilisés pour les techniques d'immunohistochimie, puis nous avons mis au point des techniques de montage à plat des tissus oculaires pour tenter d'étudier la répartition globale du TLR9 dans l'œil de la souris saine.

Matériel et méthodes

Lignées cellulaires

Notre modèle utilise la lignée 38C13 transfectée au CD20 humain, fournie gracieusement par J. Golay (laboratoire de thérapie cellulaire et génique, G. Lanzani, service d'Hématologie, Ospedoli Riuniti di Bergamo, Italie). Les cellules sont mises en suspension et cultivées, puis mises en incubation à 37°C dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂ et divisées régulièrement.

Modèle animal

Les animaux utilisés sont des souris femelles C3H/HeN pour lesquelles une lignée syngénique de lymphocytes B tumoraux existe ; elles proviennent du laboratoire Janvier, sont âgées de 4 à 6 semaines, pèsent entre 15 et 18 grammes et sont élevées à l'animalerie de la faculté de médecine de Lille (cycle jour/nuit de 12 heures, nourriture et eau *ad libitum*). Les animaux sont traités selon les règlements européens en vigueur (86/609/EEC). Nos procédures expérimentales sont approuvées par un comité d'éthique local et périodiquement contrôlées par un vétérinaire de la faculté (Dr Hubert).

Comptage des cellules avant injection

Nous utiliserons le cytomètre en flux (Beckman Coulter, Hialeah, FL, USA) équipé d'un laser Argon 500 mV. Le but est d'obtenir une solution tumorale à 1 250 cellules/μl soit 500 cellules dans les 0,4 μl injectés.

L'analyse du cytogramme (le rapport taille-structure) permet indirectement de juger de la viabilité des cellules. Les cellules tumorales sont préparées et injectées en moins de 2 heures (leur bonne viabilité dans du PBS à température ambiante a été vérifiée jusqu'à 5 heures)

Injection intravitréenne des cellules tumorales

Après anesthésie générale et topique, les animaux sont placés en décubitus ventral sous microscope opératoire. La conjonctive est maintenue à l'aide d'une pince microchirurgicale et une injection intravitréenne de 0,4 μl de cellules tumorales est réalisée grâce à une aiguille de 34 Gauges montée sur une seringue de Hamilton de 5 μl qui est introduite au niveau de la *pars plana*, située en arrière de l'anneau vasculaire. La vitesse d'injection est de 0,2 μl/minute et l'orifice conjonctival d'entrée est maintenu fermé avec une pince pendant 1 minute pour éviter un reflux.

Une application sur l'œil de collyre antibiotique (ciprofloxacine) est systématiquement effectuée après l'injection. À noter que seul l'œil droit est injecté.

Potentialisation de l'effet anti-tumoral du rituximab *in vivo*

Deux premières séries de 60 souris ont été réalisées afin d'étudier la potentialisation de l'effet anti-tumoral du rituximab par le complément en injections locales.

Cinq lots différents ont été définis pour chaque série : un lot témoin, un lot de rituximab à faible concentration (0,3 μl) combiné au complément (0,2 μl de *Guinea Pig Serum Complement*), et trois lots avec différentes concentrations de rituximab seul (0,5 μl)

Les injections sont réalisées à J2, J4 et J6. Le suivi post-injection repose sur la surveillance régulière du fond d'œil avec le système optique, et dès l'apparition d'une exophtalmie, les animaux sont sacrifiés.

La réalisation de ces grandes séries a permis de renforcer la puissance statistique de l'étude afin de comparer l'effet thérapeutique des différentes interventions.

Les courbes de survie sont élaborées selon la méthode de Kaplan-Meier (18), et la comparaison entre les effets des différents traitements est analysée grâce au test de log-rank (logiciel XL-STAT 2009).

Les expérimentations suivantes ont permis d'étudier précisément l'évolution quotidienne du fond d'œil au décours d'injections de rituximab seul ou combiné à du complément afin d'appliquer la nouvelle classification du fond d'œil que nous avons mis au point. Nous avons réalisé les injections à des temps différents en fonction de l'aspect fundoscopique.

Analyse anatomo-histo-pathologique

Sacrifice des animaux et mode de conservation des tissus

Les animaux sont sacrifiés sous anesthésie générale par injection intrapéritonéale de 0,2 ml de pentobarbital. Une perfusion intracardiale de sérum physiologique hépariné (1 ampoule à 5 000 UI dans 1 litre de NaCl) puis de paraformaldéhyde (PFA) à 4 % permettent une fixation tissulaire correcte. Après une heure de fixation *in situ*, les yeux sont prélevés puis conservés dans du PFA jusqu'à l'inclusion en paraffine.

Pour la préparation des coupes tissulaires congelées en immunohistochimie (IHC), les tissus sont fixés par immersion de 2 heures dans du PFA à 4 % (temps restreint car toxicité du PFA mise en évidence lors des précédents travaux). Puis on procède à une déshydratation par le sucre 20 pendant 20 h, et enfin les tissus sont immergés dans de l'isopentane pendant 20 min avant de les placer au congélateur à -30° jusqu'au moment de la coupe au cryostat.

Immunohistochimie sur lame et sur montage à plat

Mise au point des immunomarquages

Afin d'étudier les populations cellulaires recrutées par les ODN, plusieurs anticorps primaires ont été testés.

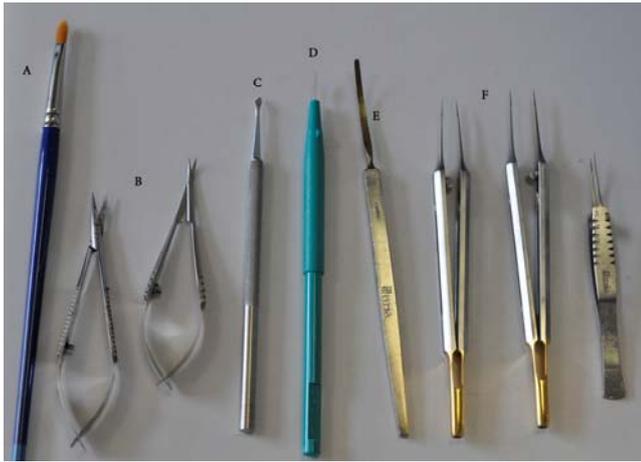


Figure 2. Instrumentation pour le montage à plat des tissus oculaires. A : Pinceau ; B : Micro-ciseaux ; C : Lame beaver ; D : Couteau 15° ; E : Spatule ; F : Pincettes fines micro-chirurgicales.

Les IHC sont réalisées dans un premier temps sur lame pour mettre au point les dilutions de l'anticorps et réaliser un échantillonnage de la population cellulaire recrutée. Les techniques de montage à plat sont ensuite réalisées pour permettre une étude plus précise de leur répartition sur le tissu analysé.

Nous avons tenté de mettre en évidence l'expression oculaire des TLR9 chez la souris C3H/HeN à l'état normal grâce à des anticorps primaires polyclonaux de Rat anti-TLR9 (mouse, HyCult biotechnology).

En raison de la pigmentation de l'iris, la fluorescence est le meilleur moyen de révélation. Ainsi les anticorps secondaires choisis sont : Alexa fluor 488 (vert) Chèvre anti-Rat IgG pour le TLR 9.

Nous avons d'abord mis au point les dilutions optimales des nouveaux anticorps, puis nous avons incubé les coupes d'œil et de rate (témoins positifs), avec les anticorps primaires pendant une nuit à 4°C. Après rinçage, les tissus sont incubés avec l'anticorps secondaire de chèvre pendant 2 h à température ambiante. Une nouvelle phase de rinçage est réalisée avant de monter les prélèvements sur lame pour les montages à plat ; l'analyse se fait secondairement au microscope confocal inversé Zeiss LSM 710 Axio Observer Z1 (objectif 40x par immersion avec huile).

Élaboration de la technique de montage à plat

Les animaux sont sacrifiés sous anesthésie générale par injection intra-péritonéale de 0,2 ml de pentobarbital. Une perfusion intracardiaque de sérum physiologique hépariné puis de paraformaldéhyde (PFA) à 4 % permet une fixation tissulaire correcte. Nous avons utilisé la technique de perfusion décrite par McMenamin en 2000 (19). Les différentes étapes pour les montages à plat sont chronologiquement :

- énucléation : les yeux sont énucléés à l'aide d'une pince mousse et de ciseaux courbes, en réalisant au préalable une double canthotomie (externe et interne) puis en sectionnant le nerf optique en arrière à l'aide des ciseaux courbes tout en maintenant une pression dans la cavité orbitaire afin de respecter l'intégrité du globe ;
- dissection microchirurgicale et montage à plat : les micro-dissections se font sous microscope opératoire, dans du PBS stérile et s'inspirent de protocoles publiés par Mc Menamin (19) pour l'iris et le corps ciliaire et par Gustmann et Dünker (20) pour la rétine.

La table d'instrumentation utilisée est donnée sur la figure 2.

Montage à plat d'iris et corps ciliaire (fig. 3A-F)

La manipulation consiste à inciser prudemment le globe oculaire (fig. 3A) immédiatement en arrière du limbe sur quelques millimètres à l'aide d'un couteau 15°, puis à l'aide de

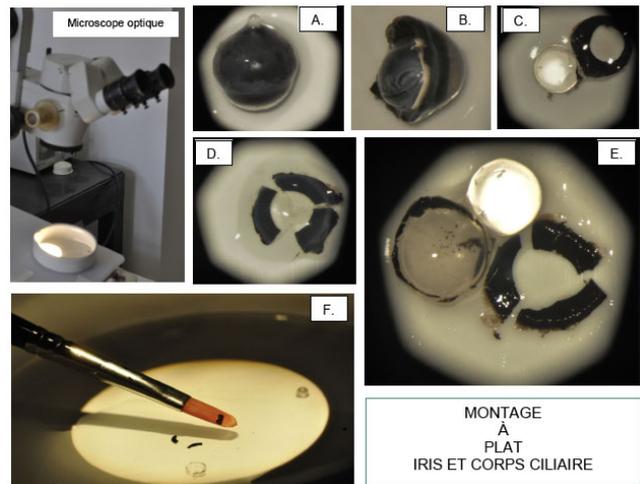


Figure 3. Montage à plat d'iris et de corps ciliaire.

ciseaux courbes à iris, l'incision est poursuivie de façon circconférentielle (fig. 3B) afin de séparer l'œil en deux parties (segment antérieur et segment postérieur). Le cristallin est délicatement libéré du reste du segment antérieur à l'aide d'une pince mousse (fig. 3C). Trois incisions radiales (fig. 3D) sont ensuite réalisées au couteau (lame *beaver* ou scarificateur) afin d'obtenir trois quartiers arciformes secondairement divisés au niveau des adhérences de l'angle irido-cornéen (fig. 3E). Les tissus sont ensuite délicatement retirés à l'aide d'un pinceau fin (fig. 3F) et placés dans du PBS stérile avant le protocole d'immunohistochimie.

Montage à plat de rétine (fig. 4A-H)

La manipulation consiste en l'ablation première des débris conjonctivaux et graisseux péri-oculaires (fig. 4A). Une traction franche sur le nerf optique à sa base (fig. 4B) est réalisée à l'aide de deux pincettes mousses afin d'obtenir une section au niveau de sa portion sclérale, créant un orifice par lequel on peut atteindre l'espace sous-rétinien (situé entre la rétine en dedans et l'épithélium pigmentaire + uvée + sclère en dehors). L'épithélium pigmentaire rétinien est facilement visualisé par sa couleur noire chez notre souris pigmentée.

La partie sclère/uvée/épithélium pigmentaire est ensuite délicatement déchirée du plan rétinien plus profond (fig. 4C) à l'aide de deux pincettes mousses à travers l'orifice scléral du

Figure 4. Montage à plat de rétine.

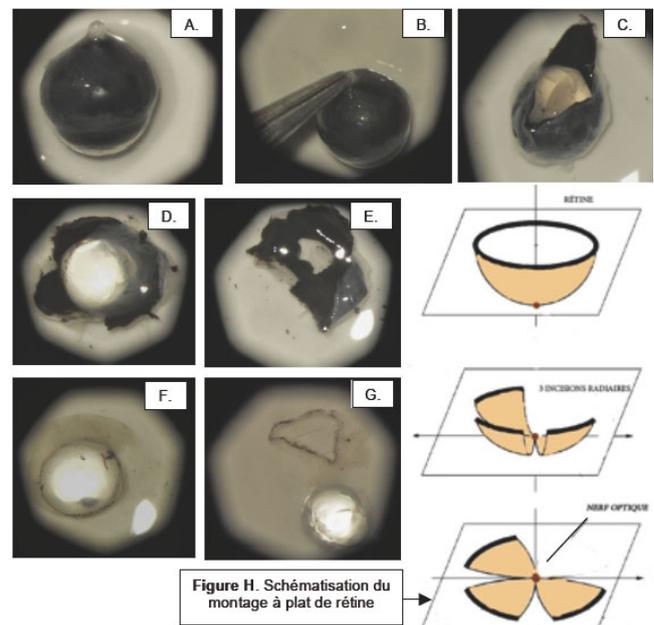


Figure H. Schématisation du montage à plat de rétine



Figure 5. TEFI (Topical Endoscopy Fundus Imaging), d'après [22].

nerf optique, par mouvements opposés de traction. Cette déchirure est ensuite prolongée en avant (fig. 4D) jusqu'au segment antérieur afin de libérer la partie profonde constituée du cristallin et de la rétine (adhérente en arrière de l'équateur du cristallin, fig. 4F), et la partie externe (cornée, uvée, sclère, iris ; fig. 4E). Le cristallin est enfin désolidarisé de la rétine au niveau de l'*ora serrata* (fig. 4G), et le vitré résiduel est délicatement décollé de la rétine interne à l'aide d'un pinceau très fin. La rétine apparaît sous la forme d'une fine membrane pellucide (fig. 4G) sur laquelle trois incisions radiaires dirigées en direction de la papille du nerf optique (précédemment sectionné) sont réalisées (fig. 4H), à l'aide de microciseaux droits. Ceci permet le montage à plat sur lame dans un unique plan pour une étude localisatrice la plus anatomique possible au cours des analyses en immunohistochimie.

Optimisation du système optique

Amélioration de la technique de photographie du fond d'œil murin

Notre système optique repose sur le principe du TEFI (*topical endoscopy fundus imaging* [21]), basé sur la connexion d'un endoscope à un appareil photographique numérique (fig. 5). Quelques modifications ont été apportées au système de Paques et al. (22) pour optimiser l'image résultante. Le meilleur contraste est obtenu avec les endoscopes à illumination latérale permettant de minimiser les déviations axiales.

Nous utilisons un endoscope pour otoscopie de 5 cm de long et de 3 mm de diamètre externe (1218 AA ; Karl Storz, Tuttlingen, Germany) avec un angle de vue de 0°. Un appareil photographique numérique (Nikon D90, Nikon AF-S 50 mm F1/1.4D, Nikon, Tokyo, Japon) est connecté à l'endoscope par un adaptateur adéquat. Il n'existe pas de lentille additionnelle entre l'endoscope et l'appareil photographique.

Les paramètres de réglage de l'appareil photographique sont les suivants : format image, *raw* ; focus, manuel ; mode opératoire, A ; diaphragme, 1/1.4, balance de blanc, automatique, sensibilité ISO 1600. La source lumineuse est une lampe xénon (Olympus CLV-S20) connectée à l'endoscope par une fibre optique flexible.

Toutes les procédures sont réalisées sur des souris anesthésiées par gaz isoflurane. Les pupilles sont dilatées avec une goutte de tropicamide 1 % (Novartis, Rueil Malmaison, France). Des agents mouillants comme du Gel-larmes (Théa, Clermont-Ferrand, France) sont appliqués sur la cornée afin d'obtenir une immersion de l'extrémité de l'endoscope en contact avec la cornée.

La partie postérieure du FO est obtenue en positionnant l'endoscope selon l'axe visuel.

L'acquisition de clichés du pôle postérieur est désormais facilitée par l'utilisation d'un pied coulissant permettant une meilleure stabilisation de l'objectif (moins de tremblements) et une bonne reproductibilité pour le suivi.

Définition et validation d'une classification clinique du fond d'œil murin

L'élaboration d'une classification a pour but de suivre de façon objective l'évolution clinique des lésions au cours du lymphome oculaire et au décours des différents traitements administrés

La classification proposée s'inspire de celle proposée par Xu et al. en 2008 (23) pour quantifier l'inflammation rétinienne dans le cadre d'un modèle d'uvéite expérimentale auto-immune chez la souris C57BL/6. Elle présente 4 stades (de 0 à 3 par ordre de sévérité croissante) décrits dans le tableau 1.

Afin de valider cette classification, nous avons sollicité cinq observateurs différents pour analyser de manière indépendante des clichés de fond d'œil murin pris à différents stades évolutifs du lymphome oculaire, et répartis de manière aléatoire. Il y avait en tout 18 clichés. Il leur a été demandé de les classer selon les données de la classification proposée. Les cinq lecteurs étaient internes en ophtalmologie au CHRU de Lille, mais n'avaient pas d'expérience dans l'interprétation du fond d'œil murin.

Nous avons analysé les classements de chaque observateur, et les avons comparés avec nos propositions pour chaque cliché, afin de calculer les coefficients de corrélation pour chaque lecteur et pour chaque stade. L'ensemble des données a été analysé pour évaluer le coefficient de corrélation de rang de Spearman (test non paramétrique, pour des variables ordinales [24], à l'aide du logiciel SPSS).

Développement de l'angiographie rétinienne à la fluorescéine

Nous avons cherché à mettre au point une technique d'angiographie rétinienne chez la souris C3H/HeN en adaptant et en modifiant notre système de TEFI. Il existe peu de travaux utilisant cette technique d'imagerie chez la souris du fait des difficultés de réalisation technique (petite taille de l'œil murin), et du fait de la nécessité d'étudier des souris pigmentées (hyperfluorescence importante gênant l'interprétation des clichés chez les souris « albinos »).

Il nous semble intéressant de développer cette technique afin d'objectiver si possible un parallèle entre notre modèle murin et la pathologie humaine. Nous avons réalisé les premiers essais sur des yeux sains afin d'optimiser la technique (qualité d'image, filtres utilisés) et déterminer la dose de fluorescéine

Tableau 1. Tableau des coefficients de corrélation de Spearman entre les 5 observateurs.

**La corrélation est significative au niveau 0,01 (bilatéral).

		OBS 1	OBS 2	OBS 3	OBS 4	OBS 5	TEST
Rho de OBS 1	Coefficient de corrélation	1.000	.945**	.914**	1.000**	.945**	1.000**
	Sig. (bilatérale)	.	.000	.000	.	.000	.
	N	18	18	18	18	18	18
OBS 2	Coefficient de corrélation	.945**	1.000	.975**	.945**	.890**	.945**
	Sig. (bilatérale)	.000	.	.000	.000	.000	.000
	N	18	18	18	18	18	18
OBS 3	Coefficient de corrélation	.914**	.975**	1.000	.914**	.853**	.914**
	Sig. (bilatérale)	.000	.000	.	.000	.000	.000
	N	18	18	18	18	18	18
OBS 4	Coefficient de corrélation	1.000**	.945**	.914**	1.000	.945**	1.000**
	Sig. (bilatérale)	.	.000	.000	.	.000	.
	N	18	18	18	18	18	18
OBS 5	Coefficient de corrélation	.945**	.890**	.853**	.945**	1.000	.945**
	Sig. (bilatérale)	.000	.000	.000	.000	.	.000
	N	18	18	18	18	18	18
TEST	Coefficient de corrélation	1.000**	.945**	.914**	1.000**	.945**	1.000
	Sig. (bilatérale)	.	.000	.000	.	.000	.
	N	18	18	18	18	18	18

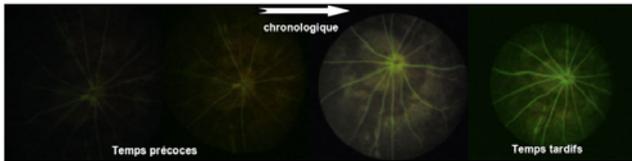


Figure 6. Séquence angiographique normale chez la souris C3H/HeN saine.

adéquate (dose minimale permettant une bonne visualisation du fundus avec une bonne tolérance).

Protocole expérimental

Les paramètres de réglage de l'appareil photos doivent être modifiés par rapport au TEFI standard (sensibilité ISO à 3200 et diaphragme rétréci à 2.8).

Nous utilisons la fluorescéine pour injection intraveineuse qui se présente sous forme d'ampoules de 5 mL de fluorescéinate de sodium à 10 % (soit 500 mg).

La dose optimale injectée en intrapéritonéal est de 50 à 80 µl, permettant une visualisation correcte des vaisseaux rétiniens ainsi qu'une bonne tolérance chez la souris. Cette dose est fonction du poids de l'animal (18 à 20 g), semblable à celle utilisée par Hawes en 1999 (25) et par Paques en 2006 (26). La procédure se fait sous anesthésie gazeuse selon le même protocole que pour le TEFI.

Les principaux effets secondaires sont une coloration jaune et transitoire (2 heures environ) des muqueuses et de l'urine ; il faut s'assurer d'une hydratation correcte de l'animal après l'examen.

Aucune allergie ou intolérance grave n'a été mise en évidence au cours de nos expérimentations. Après l'injection intrapéritonéale, le temps le plus précoce visualisable est le temps artériel, qui se situe entre 40 secondes et 1 minute environ. La fluorescence perdure plusieurs minutes, d'autant plus qu'il existe des fuites vasculaires (fig. 6).

Résultats

Potentialisation de l'action du rituximab par injection intra-oculaire de complément

Résultats des séries 1 et 2

Les séries 1 et 2 comprenaient 120 souris réparties en cinq lots :

- lot 1 : rituximab seul à [0,7] µg/µl (n = 26) ;
- lot 2 : rituximab seul à [0,28] µg/µl (n = 26) ;
- lot 3 : rituximab seul à [0,1] µg/µl (n = 26) ;
- lot 4 : rituximab à [0,1] µg/µl + complément (n = 26) ;
- lot 5 : témoins (n = 16).

La proportion d'exophtalmies (fig. 7) et l'analyse de survie de Kaplan-Meier (test de log-rank [18]) ont été étudiées et les résultats sont présentés dans les figures 7 à 9. Il apparaît une différence significative en faveur du traitement combiné (rituximab à faible concentration avec complément), par rapport au lot témoin et au rituximab seul à la même concentration.

Classification clinique du fond d'œil murin

Élaboration et validation statistique

Le tableau 1 présente les résultats du coefficient de corrélation de rang de Spearman sur l'ensemble des données. On observe une très bonne corrélation (coefficient maximal à 1 et minimal à 0,853).

Nous avons ensuite analysé les résultats de chaque observa-

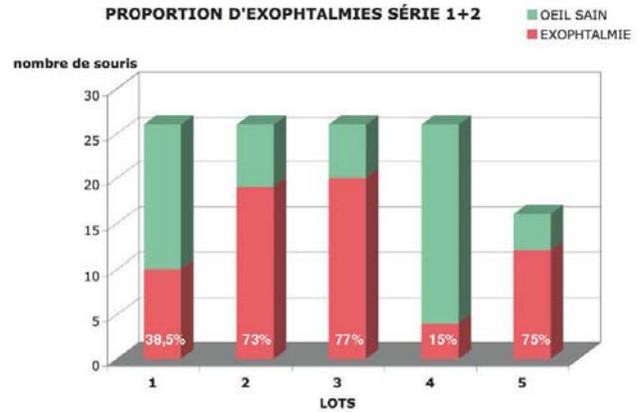


Figure 7. Expérimentation animale : proportion d'exophtalmies pour les 5 lots.

- lot 1 : rituximab seul à [0,7] µg/µl (n = 26) ;
- lot 2 : rituximab seul à [0,28] µg/µl (n = 26) ;
- lot 3 : rituximab seul à [0,1] µg/µl (n = 26) ;
- lot 4 : rituximab à [0,1] µg/µl + complément (n = 26) ;
- lot 5 : témoins (n = 16).

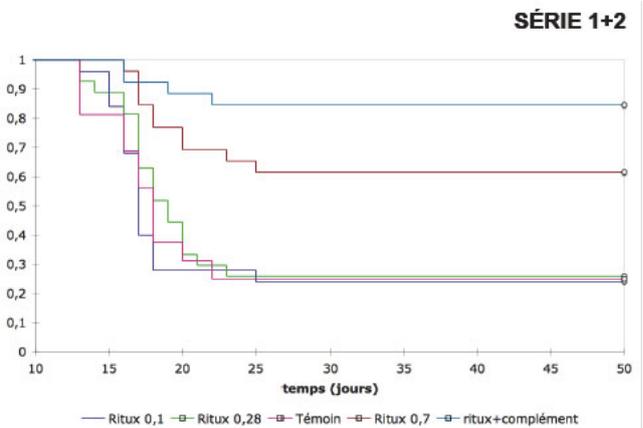


Figure 8. Courbes de Kaplan-Meier pour les 5 lots.

- lot 1 : rituximab seul à [0,7] µg/µl (n = 26) ;
- lot 2 : rituximab seul à [0,28] µg/µl (n = 26) ;
- lot 3 : rituximab seul à [0,1] µg/µl (n = 26) ;
- lot 4 : rituximab à [0,1] µg/µl + complément (n = 26) ;
- lot 5 : témoins (n = 16).

Analyse de survie de Kaplan-Meier

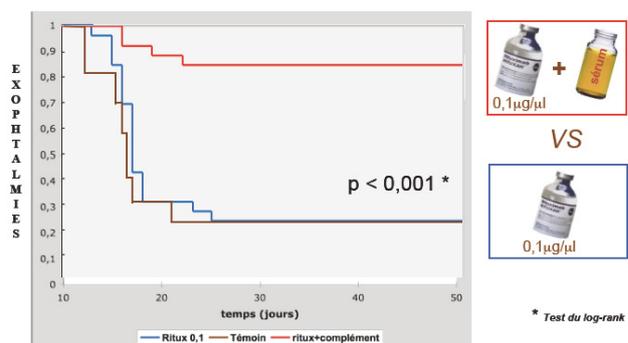


Figure 9. Courbes de Kaplan Meier et test du log rank (traitement combiné versus traitement par rituximab seul).

teur et comparé ses réponses avec celles des autres observateurs. Le diagramme de corrélation est présenté figure 10. Sur l'ensemble des 90 réponses données par les différents observateurs, nous avons observé seulement sept erreurs de cotation, avec un écart d'un stade maximum.

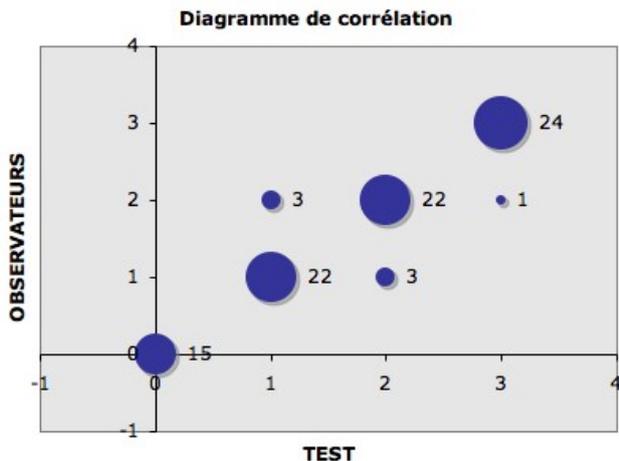


Figure 10. Diagramme de corrélation sur l'ensemble des réponses données par les 5 observateurs.

Définition de la classification clinique du FO et applications

L'amélioration des techniques d'injection vitrénne (aiguille 34 Gauges et seringue Hamilton 5 µl) a permis de limiter l'incidence des cataractes traumatiques qui gênaient la visibilité du FO. La stabilisation renforcée de notre système optique permet de réaliser des clichés reproductibles centrés sur la papille optique. La classification clinique définie est présentée tableau 2 et figure 11. Elle se calque sur l'évolution naturelle du LPIO au cours des clichés réguliers réalisés avec l'aide du système TEFI optimisé (fig. 12).

INFILTRAT VITRÉEN AU POLE POSTÉRIEUR chez la souris C3H/HeN

STADES	LESIONS AU FO
0	NORMAL : bonne visualisation de la papille et des vaisseaux rétiens
1	Flou papillaire et infiltrats vitréens pré-papillaires. Vaisseaux nets
2	Infiltrats vitréens plus diffus mais fundus et vaisseaux partiellement visibles
3	Infiltrat majeur et total, fundus et vaisseaux non visibles

Tableau 2. Définition de la classification clinique du fond d'œil murin au cours du LPIO.

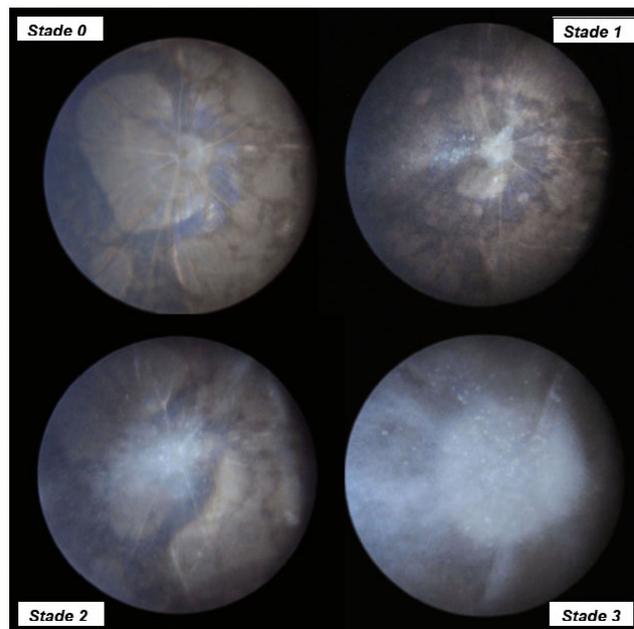


Figure 11. Classification clinique du fond d'œil murin au cours du LPIO.

La figure 13 présente un exemple d'application de cette classification pour évaluer l'évolution clinique du fond d'œil murin au décours d'un traitement intravitréen par rituximab à la concentration de [0,7] µg/µl (comme le lot 1 de notre série animale).

Angiographie rétinienne à la fluorescéine

La figure 14 présente deux exemples d'évolution angiographique de l'atteinte oculaire au cours du LPIO chez notre modèle murin.

Localisation de l'expression oculaire du TLR9

Mise au point et résultats des expériences préliminaires en immunofluorescence

Lors de la recherche des dilutions optimales pour les anticorps anti-TLR 9 polyclonal et anticorps secondaire Alexa fluor 488 (fig. 15 A et B), on retrouve une fluorescence verte sur le témoin positif (rate, 15A), plus marquée sur les bords (effet de zone) ; on ne retrouve pas de fluorescence sur le témoin négatif (seule coloration des noyaux par le DAPI, 15B). La dilution optimale est de 1/500 sur les tests effectués.

Essais préliminaires sur lame et sur montage à plat

La figure 16 présente un essai d'immunomarquage du TLR9 sur coupe congelée de rétine chez la souris saine (avec la coupe histologique correspondante pour faciliter la localisation des structures marquées). On observe une fluorescence granulaire diffuse, prédominant dans les couches internes de la rétine (cellules ganglionnaires) et en bordure des noyaux de la couche nucléaire interne.

La figure 17 montre les essais d'immunomarquage du TLR9 sur



Figure 12. Evolution clinique naturelle du LPIO au fond d'œil.

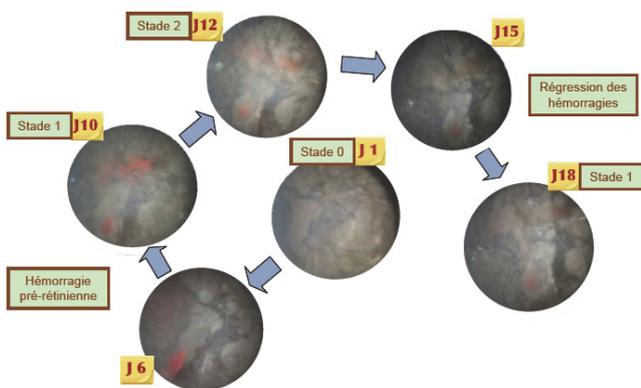


Figure 13. Application de la classification au décours du traitement par rituximab à forte dose (injections intra-vitréennes à J2, J4 et J6).

Évolution angiographique de l'atteinte oculaire

Dans l'ordre chronologique des temps précoces aux temps tardifs pour chaque groupe de photos
: S1=souris 1 et S2=souris 2

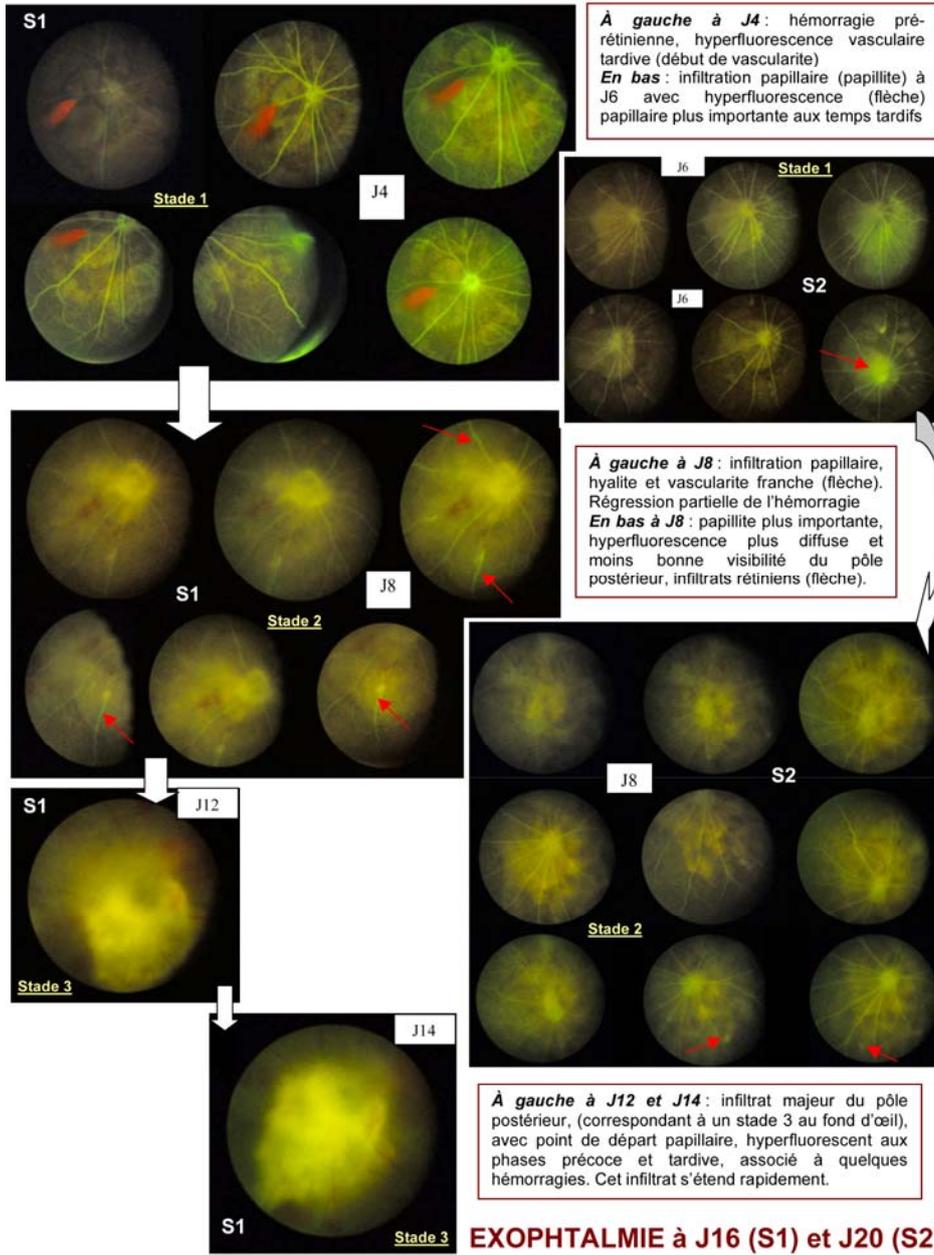
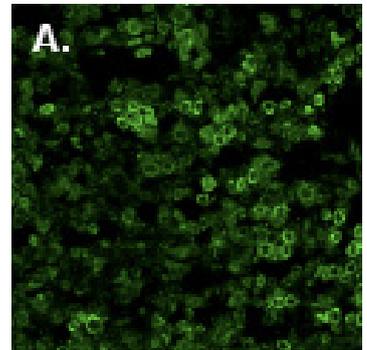
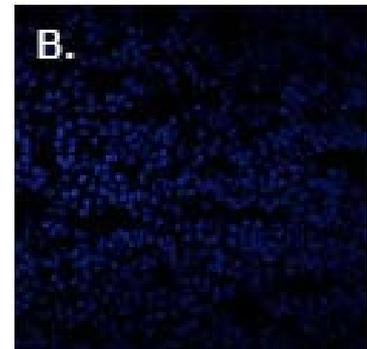


Figure 14. Evolution angiographique de l'atteinte oculaire au cours du LPIO.



TLR9 à 1/500e positif rate



TLR9 à 1/500e négatif rate

Figure 15. Mise au point des dilutions des anticorps anti-TLR9.

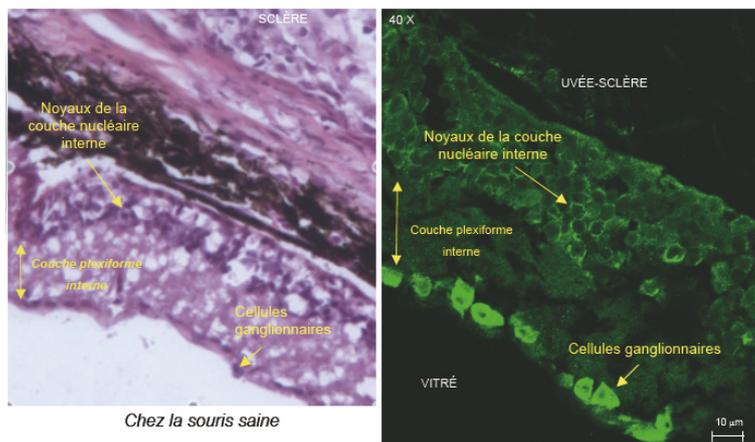


Figure 16. Coupe congelée de rétine, immunomarquage par anticorps anti-TLR9.

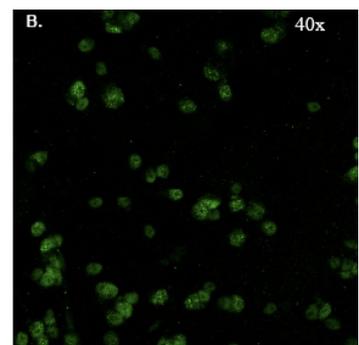
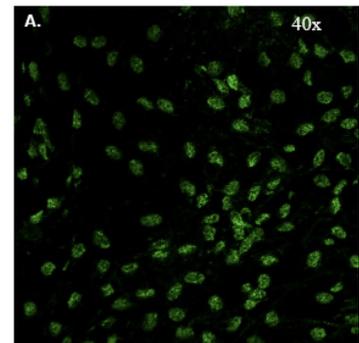


Figure 17. Immunohistochimie sur montage à plat d'iris (A) et de rétine (B).

Chez la souris saine

montage à plat de l'iris (fig. 17A) et de rétine (fig. 17B). On retrouve également une fluorescence verte cytoplasmique granulaire des cellules de la partie médiane de l'iris (aspect de mélanocytes, fig. 17A). La fluorescence est similaire sur la rétine (fig. 17B), mais il est difficile de déterminer avec précision dans quelle couche rétinienne exacte se trouvent les cellules sur nos échantillons de montage à plat.

Discussion

Optimisation de l'analyse du modèle animal

Amélioration du système optique et de la technique d'injection

Nous avons optimisé la technique pour la réalisation de clichés de fond d'œil permettant d'obtenir des clichés de meilleure qualité (en supprimant notamment tous les mouvements parasites), et une plus grande reproductibilité pour standardiser notre protocole de suivi évolutif.

La réduction des traumatismes oculaires par l'utilisation d'aiguilles plus fines (34 Gauges) pour injecter cellules tumorales et thérapeutiques a permis une meilleure surveillance du fond d'œil en maintenant les milieux transparents.

Ce système optique permettra la conception d'autres modèles animaux portant sur le segment postérieur en ophtalmologie tant pour caractériser l'histoire naturelle des affections rétinienne que pour monitorer les thérapeutiques.

Cette approche calquée sur la pratique clinique apparaît également moins coûteuse et plus rapide qu'une analyse histologique systématique.

Élaboration de la classification clinique du fond d'œil murin

Avec l'optimisation du TEFI, nous avons pu élaborer une classification de l'infiltrat vitréorétinien lymphomateux de nos souris C3H/HeN, pour décrire avec précision l'aspect évolutif de cette hémopathie intra-oculaire. Cette méthode est venue compléter l'inspection ophtalmologique régulière à la recherche d'une exophtalmie, considérée initialement comme le meilleur critère d'évolutivité tumorale, mais n'apparaissant qu'à un stade évolué du lymphome oculaire.

Nous avons choisi de réaliser des clichés du pôle postérieur centrés sur la papille car ils offrent de multiples avantages :

- facilité de réalisation et d'interprétation (visibilité de la papille, de tous les vaisseaux et de la moyenne périphérie rétinienne) ;
- reproductibilité pour le suivi évolutif (pour apprécier précisément les modifications inflammatoires au fond d'œil) ;
- pertinence dans l'étude des lésions vitré-réliniennes du LPIO (hyalite et papillite sont constantes au cours de l'évolution de cette pathologie).

Afin de faciliter les cotations et les interprétations par des observateurs différents, nous avons choisi une description simplifiée des quatre stades cliniques définis. L'analyse statistique a permis de valider cette classification, retrouvant une très bonne corrélation entre tous les observateurs, et l'absence d'erreur importante d'interprétation des clichés (différence d'un stade au maximum).

Ces quatre stades correspondent à l'évolution naturelle et stéréotypée du LPIO au fond d'œil.

Cette classification plus proche des aspects cliniques rencontrés chez l'homme facilitera la transposition d'essais thérapeutiques basés sur le degré d'infiltration vitréenne.

Développement de l'angiographie rétinienne

Le développement d'une telle technique permet d'approfondir l'approche diagnostique du LPIO au sein de notre modèle

murin, pour ainsi tenter d'établir un parallèle avec la pathologie humaine. En effet, certains aspects angiographiques sont évocateurs de lymphome chez l'homme : il s'agit de lésions hypofluorescentes ponctiformes retrouvées dès le temps précoce qui perdurent aux temps tardifs (et correspondent aux infiltrats jaune-orangé visibles au fond d'œil). Cependant, ces aspects ne sont pas retrouvés sur nos clichés, peut-être en raison de la pigmentation du FO de nos souris et du trouble vitréen. Néanmoins, cet examen permet de mettre en évidence :

- une hyperfluorescente papillaire en rapport avec une papillite ;
- une vascularite rétinienne sous la forme d'une hyperfluorescence segmentaire et focale des vaisseaux ;
- un infiltrat lymphomateux (de taille croissante au cours de l'évolution) sous la forme d'une zone hyperfluorescente du pôle postérieur.

Ces signes sont non-spécifiques de lymphome, et plutôt en rapport avec la coexistence de phénomènes inflammatoires.

La mise au point de l'angiographie rétinienne permettra l'analyse d'autres tumeurs intra-oculaires (mélanome, rétinoblastome...), d'infections (toxoplasmose, candidose...), ou d'occlusions vasculaires rétinienne. D'ailleurs, une technique d'angiographie haute résolution par *confocal Scanning Laser Ophthalmoscope* (cSLO) a été proposée en 2006 pour l'étude de pathologies rétinienne chez la souris (60), mais cette technologie n'est disponible que dans quelques grands laboratoires spécialisés.

Optimisation de l'approche thérapeutique

Efficacité du rituximab et association du complément en injection locale

Les précédents travaux (17) ont montré l'efficacité du rituximab en monothérapie injecté à J2-J4-J6, ainsi que l'innocuité du sérum en injection oculaire chez la souris. La nécessité de traiter précocement s'explique par la cinétique de croissance tumorale des cellules 38C13CD20.

Nos deux séries regroupant 120 souris confirment ces résultats avec une diminution significative du nombre d'exophtalmies pour le lot n°1 avec une concentration de rituximab seul à 0,7 µg/µl.

Nous avons également mis en évidence une différence statistiquement significative dans l'apparition et le délai des exophtalmies entre le groupe rituximab seul à la concentration intra-vitréenne de 0,1 µg/µl (lot n°3) et le groupe de traitement combiné (rituximab et complément). Ainsi l'ajout de sérum a permis d'augmenter l'efficacité thérapeutique du rituximab, avec une bonne tolérance oculaire.

Actuellement, il n'y a toujours pas de consensus sur le traitement optimal du LPIO (27). Il a été démontré qu'il pénètre toutes les couches de la rétine chez le lapin, avec une demi-vie dans le vitré de 4,7 jours (28). Les auteurs ne retrouvaient pas de toxicité clinique ni histologique à la dose injectée de 0,1 mg/0,1 ml.

Le rituximab reste donc un candidat idéal pour une immunothérapie adjuvante locale, avec des résultats encourageants chez l'homme (27, 29, 30).

Des injections intravitréennes de rituximab (1 mg/0,1 ml) ont été administrées à deux patients présentant un lymphome intra-oculaire récidivant (un cas primitif et un cas de localisation secondaire oculaire de LPSNC), après arrêt des injections de méthotrexate pour intolérance (lésions sévères de l'épithélium cornéen) (29). La hyalite et les infiltrats rétinien profonds avaient significativement diminué après la première injection, pour disparaître après la deuxième. Tous deux ont reçu quatre injections hebdomadaires sans qu'aucune récurrence n'ait pu être mise en évidence pendant 2 mois.

De plus, l'administration de plasma frais congelé a permis de

renforcer l'efficacité du rituximab chez des patients présentant une leucémie lymphoïde chronique réfractaire (31, 32). Chez l'homme, certains composés du complément sont présents dans l'œil à des taux faibles (34-36), ce qui nous fait présager de la probable innocuité des injections intravitréennes de sérum autologue comme source de complément.

Expression oculaire du TLR9

Les ODN représentent une autre thérapeutique locale adjuvante du lymphome oculaire. Mais pour espérer prouver l'efficacité d'un tel traitement, il fallait vérifier la présence de TLR 9 dans l'œil de notre lignée murine.

Nous avons mis au point et développé une technique de montage à plat d'iris et de rétine afin d'étudier la densité globale de l'expression oculaire du TLR 9.

Après la phase de mise au point des dilutions optimales, les anticorps utilisés apparaissent valides et spécifiques.

Nos études préliminaires en immunofluorescence ont retrouvé chez les souris normales une fluorescence granulaire de type cytoplasmique, irienne (mélanocytes) et rétinienne (dans les couches internes principalement).

De nouvelles expériences de marquages multiples s'attacheront à préciser si des cellules présentatrices d'antigène expriment le TLR 9 (vu leur rôle princeps dans l'activité immunostimulante des ODN). Il semble ainsi logique d'utiliser d'autres marqueurs (de cellules dendritiques, de mélanocytes, de cellules gliales) pour déterminer précisément la localisation du TLR 9 à l'état normal. Par la suite, il sera intéressant d'étudier et de comparer l'expression oculaire du TLR 9 chez les souris traitées par injections d'ODN, afin de mettre en évidence une éventuelle hyperexpression de ces récepteurs suite à la stimulation induite par les ODN.

Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons montré une efficacité des injections locales combinant du rituximab à faible dose et du sérum dans notre modèle murin de lymphome oculaire B, soulignant ainsi la sensibilité particulière des cellules tumorales à la cytotoxicité médiée par le complément.

Ce type d'approche nous semble prometteur dans le traitement du LPIO puisque l'utilisation de complément permet de limiter la dose de rituximab injectée dans le vitré.

D'autre part, nous avons amélioré notre système de photographie du fond d'œil afin d'affiner l'analyse des lésions lymphomateuses intra-oculaires chez la souris. Cela nous a permis d'élaborer et de valider une classification clinique de l'infiltrat vitréo-rétinien permettant d'évaluer l'effet des traitements administrés de manière plus précoce et plus objective. L'évolution du LPIO apparaît stéréotypée en l'absence de traitement sur les clichés chronologiques réguliers (passant par tous les stades de la classification définie avant l'exophtalmie), alors qu'on observe une moindre évolutivité des lésions lymphomateuses, voire leur régression, après les injections thérapeutiques.

La réalisation d'angiographies rétinienne à la fluorescéine n'a pas retrouvé de lésions rétinienne spécifiques, contrairement à ce qui est noté en pathologie humaine. Cette technique pourra néanmoins être utilisée pour explorer d'autres modèles de pathologies rétinienne.

Enfin, souhaitant utiliser des ODN en adjuvant thérapeutique dans notre modèle, nous avons étudié la localisation oculaire du TLR9 chez la souris normale pour tenter d'identifier les types de cellules impliquées dans cette approche thérapeutique. La répartition des cellules exprimant le TLR9 chez la souris saine a été analysée par une technique originale de montage à plat d'iris et de rétine. Nos premières expériences ont permis de valider les anticorps utilisés en immunohistochimie et d'observer une fluorescence granulaire dans l'iris et la rétine en microscopie confocale. De nouvelles expériences

avec plusieurs marqueurs des cellules dendritiques permettront peut-être de mieux appréhender le processus immunologique déclenché par l'injection d'ODN.

Conflits d'intérêts : Aucun

Questions/Réponses

Questions du Professeur Phuc Le Hoang

Question n° 1

Quels sont les volumes respectifs de l'Ac anti-CD20 et du complément pour les injections intra-vitréennes combinées ?

Réponse

Nous avons injecté 0,3 µl d'Ac anti-CD20 à la concentration de 0,1 µg/µl et 0,2 µl de sérum, soit 0,5 µl injectés en tout dans le cadre des injections intravitréennes combinées (lot n°4 de notre série animale)

Question n° 2

Avez-vous tenté de traiter une fois la tumeur développée ?

Réponse

Oui, nous avons tenté d'injecter les thérapeutiques après que l'infiltrat tumoral soit apparu au fond d'œil. Elles ont été réalisées lors de la constatation au fond d'œil d'un stade 1 de la classification définie (soit vers J6), mais nous n'avons pas observé d'efficacité significative lorsque les injections sont réalisées plus tardivement. Ceci s'explique par la cinétique de croissance des cellules tumorales 38C13, et par le fait que les volumes thérapeutiques injectés (0,5 µl) n'apparaissent plus suffisants pour maîtriser et contenir l'extension tumorale rétinienne et postérieure déjà importante à ce stade dans notre modèle murin.

Question n° 3

Avez-vous utilisé un anticorps ne nécessitant pas de complément ?

Réponse

Non. Il s'agit d'un nouveau type d'anticorps découvert récemment. Nous n'en disposons pas dans notre laboratoire mais d'autres équipes développent cette nouvelle voie thérapeutique (en particulier le Centre de Recherches Biomédicales des Cordeliers à Paris, avec le Dr Sylvain Fisson).

Références

- Coupland SE, Heimann H. Primary intraocular lymphoma. *Ophthalmology* 2004 ; 101 : 87-98.
- Commins DL. Pathology of primary central nervous system lymphoma. *Neurosurg Focus* 2006 ; 21 : E2.
- Kadoch C, Treseler P, Rubenstein JL. Molecular pathogenesis of primary central nervous system lymphoma. *Neurosurg Focus* 2006 ; 21 : E1.
- Gündüz K, Pulido JS, McCannel CA, O'Neill BP. Ocular manifestations and treatment of central nervous system lymphomas. *Neurosurg Focus* 2006 ; 21 : E9.
- Eichler AF, Batchelor TT. Primary central nervous system lymphoma: presentation, diagnosis and staging. *Neurosurg Focus* 2006 ; 21 : E15.
- Chamberlain MC. Lymphomatous meningitis in primary central nervous system lymphoma. *Neurosurg Focus* 2006 ; 21 : E6.
- Bataille B, Delwail V, Menet E, Vandermarcq P, Ingrand P, et al. Primary intracerebral malignant lymphoma: report of 248 cases. *J Neurosurg* 2000 ; 92 : 261-6.
- Bessell EM, Hoang-Xuan K, Ferreri AJ, Reni M. Primary central nervous system lymphoma: biological aspects and controversies in management. *Eur J Cancer* 2007 ; 43 : 1141-52.
- de Smet MD, Vancs VS, Kohler D, Solomon D, Chan CC. Intravitreal chemotherapy for the treatment of recurrent intraocular lymphoma. *Br J Ophthalmol* 1999 ; 83 : 448-51.
- Smith JR, Rosenbaum JT, Wilson DJ, Doolittle ND, Siegal T, et al. Role of intravitreal methotrexate in the management of primary central nervous system lymphoma with ocular involvement. *Ophthalmology* 2002 ; 109 : 1709-16.
- Frenkel S, Hendler K, Siegal T, Shalom E, Pe'er J. Intravitreal methotrexate for treating vitreoretinal lymphoma. *Br J Ophthalmol* 2008 ; 92 : 383-8.

12. Sou R, Ohguro N, Maeda T, Saishin Y, Tano Y. Treatment of primary intraocular lymphoma with intravitreal methotrexate. *Jpn J Ophthalmol* 2008 ; 52 : 167-74.
13. Rodriguez J, Gutierrez A. Pharmacokinetic properties of rituximab. *Rev Recent Clin Trials* 2008 ; 3 : 22-30.
14. Sacchi S, Federico M, Dastoli G, Fiorani C, Vinci G, et al. Treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphoma with anti CD20 monoclonal antibody Rituximab. *Crit Rev Oncol Hematol* 2001 ; 37 : 13-25.
15. Fardeau C, Lee CP, Merle-Béral H, Cassoux N, Bodaghi B, et al. Retinal fluorescein, indocyanin green angiography, and optic coherence tomography in non-hodgkin primary intraocular lymphoma. *Am J Ophthalmol* 2009 ; 147 : 886-94.
16. Rubenstein JL, Combs D, Rosenberg J, Levy A, McDermott M, et al. Rituximab therapy for CNS lymphomas: targeting the leptomeningeal compartment. *Blood* 2003 ; 101 : 466-8.
17. Mineo JF, Scheffer A, Karkoutly C, Nouvel L, Kerdraon O, et al. Using human CD20-transfected murine lymphomatous B-cells to evaluate the efficacy of intravitreal and intracerebral rituximab injections in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008 ; 49 : 4738-53.
18. Kaplan EL, Meier P. Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958 ; 53 : 457-81.
19. McMennamin PG. Optical Methods for Preparation and Immunostaining of Iris Ciliary Body, and Choroidal Wholemounts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000 ; 41 : 3043-48.
20. Gustmann S, Dünker N. In vivo-like organotypic murine retinal wholemount culture. *JoVE* 2010. 35. <http://www.jove.com/index/details.stp?id=1634>.
21. Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol* 2004 ; 4 : 249-58.
22. Paques M, Guyomar JL. Panretinal, high-resolution color photography of the mouse fundus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007 ; 48 : 2769-74.
23. Xu H, Koch P, Chen M, Lau A, Reid DM, et al. A clinical grading system for retinal inflammation in the chronic model of experimental autoimmune uveoretinitis using digital fundus images. *Exp Eye Res* 2008 ; 87 : 319-26.
24. Artusi R, Verderio P, Marubini E. Bravais-Pearson and Spearman correlation coefficients: meaning, test of hypothesis and confidence interval. *The International Journal of Biological Markers* 2002 ; 17 : 148-51.
25. Hawes NL, Smith RS, Chang B, Davisson M, Heckenlively JR, John SW. Mouse fundus photography and angiography: a catalogue of normal and mutant phenotypes. *Mol Vis* 1999 ; 5 : 22.
26. Paques M, Simonutti M, Roux JM, Picaud S, Levavasseur E, et al. High resolution fundus imaging by confocal scanning laser ophthalmoscopy in the mouse. *Vision Res* 2006 ; 46 : 1336-45.
27. Algazi AP, Kadoch C, Rubenstein JL. Biology and treatment of primary central nervous system lymphoma. *Neurotherapeutics* 2009 ; 6 : 587-97.
28. Pulido JS, Bakri SJ, Valyi-Nagy T, Shukla D. Rituximab penetrates full-thickness retina in contrast to tissue plasminogen activator control. *Retina* 2007 ; 27 : 1071-3.
29. Ohguro N, Hashida N, Tano Y. Effect of intravitreal rituximab injections in patients with recurrent ocular lesions associated with central nervous system lymphoma. *Arch Ophthalmol* 2008 ; 126 : 1002-3.
30. Pulido JS. Rituximab for intraocular lymphoma. *Retina* 2009 ; 29 : 129-32.
31. Klepfish A, Rachmilewitz EA, Kotsianidis I, Patchenko P, Schattner A. Adding fresh frozen plasma to rituximab for the treatment of patients with refractory advanced CLL. *QJM* 2008 ; 101 : 737-40.
32. Taylor R. Fresh frozen plasma as a complement source. *Lancet Oncol* 2007 ; 8 : 370-1.
33. Rus H, Cudrici C, David S, Niculescu F. The complement system in central nervous system diseases. *Autoimmunity* 2006 ; 39 : 395-402.
34. Jha P, Bora PS, Bora NS. The role of complement system in ocular diseases including uveitis and macular degeneration. *Mol Immunol* 2007 ; 44 : 3901-8.
35. Bora NS, Jha P, Bora PS. The role of complement in ocular pathology. *Semin Immunopathol* 2008 ; 30 : 85-95.