

UNIVERSITE PARIS-VAL-DE-MARNE  
FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

\*\*\*\*\*

ANNEE 2002

N°

**THESE**  
**POUR LE DIPLOME D'ETAT**  
**DE**  
**DOCTEUR EN MEDECINE**  
**Discipline : Ophtalmologie**

**Présentée et soutenue publiquement le 02 mai 2002**

**à CRETEIL**

**Par Sophie RODRIGUES-GRILLON**

**Née le 06 JUIN 1971 à CHENNEVIERES SUR MARNE**

**TITRE : MEMBRANES EPIMACULAIRES ET VERT  
D'INDOCYANINE : ETUDE EN MICROSCOPIE CONFOCALE.**

**PRESIDENT DE THESE :**

Mr le Pr. Christophe BAUDOUIN

**LE CONSERVATEUR DE LA  
BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE**

**DIRECTEUR DE THESE**

Mme LE Dr. ULLERN

*A Monsieur le Professeur BAUDOUIN,  
Que je remercie d'avoir supervisé ce travail  
et accepté la présidence de ce jury.*

*A Madame le Docteur ULLERN ,  
pour ses qualités pédagogiques,  
pour la patience avec laquelle elle a dirigé cette étude.*

*A tous les membres du jury,  
je les remercie d'accepter de juger de ce travail*

*Au Docteur BAUDRIMONT,  
Pour ses conseils avisés et sa collaboration.*

*Au Docteur BELLIFIQ,  
Au Docteur LOZATO,  
Pour leur travail en laboratoire  
Permettant d'illustrer cette étude.*

*A tous mes maîtres d' internat :*

*Monsieur le Professeur DUFIER*

*Madame le Docteur BONSCH,*

*Monsieur le Docteur LE MER,*

*Monsieur le Docteur BREZIN,*

*Madame le Professeur SOUBRANE,*

*Madame le Docteur ULLERN.*

*Et en particulier*

*Madame le Docteur SALVANET-BOUCCARA ,*

*Qui m'accorde sa confiance.*

*Monsieur le Professeur HOANG-XUAN,*

*Je le remercie vivement et sincèrement pour son enseignement patient,*

*Pour avoir fait de ses derniers mois de formation une période inoubliable.*

*A mes Parents ,  
D'une si grande dévotion,  
Que jamais je ne pourrais suffisamment remercier .*

*A Philippe,*

*A Christophe,  
Qui est resté à mes côtés  
Pour le pire et le meilleur...*

*A Vincent et Mathieu ,  
Qui m'émerveillent chaque jour.*

*A tous mes chefs de clinique et assistants,  
Qui m'ont guidés tout au long de ma formation*

*A tous mes sympathiques compagnons de travail,*

*A Sandrine,*

## TABLE DES MATIERES

### CHAPITRE UN : RAPPEL ANATOMIQUE

#### I. LA RÉTINE

- A. Structure générale
- B. Particularité de la région maculaire

#### II. UN TISSU DE SOUTIEN

##### A. LA JONCTION VITRÉO-RÉTINIENNE

###### I. LA MEMBRANE LIMITANTE INTERNE

- histologie
- Les variations topographiques
- Les variations physiologiques

###### II. LE VITRÉ POSTÉRIEUR

- Structure
- Les adhésions vitréo-rétiniennes physiologiques

###### III. LE DÉCOLLEMENT POSTÉRIEUR DU VITRÉ

- Définition
- Modifications du Vitré
- Constitution du DPV
- La prévalence du DPV

## CHAPITRE DEUX : LES MEMBRANES ÉPIRÉTINIENNES

### I. GÉNÉRALITÉS

- A. Historique
- B. Clinique et classification**

### II. PATHOGÉNIE

- A. Aspect histologique
- B. Les composants cellulaires
- C. La matrice extracellulaire

### III. HYPOTHÈSES PHYSIOPATHOLOGIQUES

- A. Origine rétinienne
- B. Origine vitrénne**
- C. Synthèse

### IV. IMPLICATIONS THERAPEUTIQUES : ABLATION DE LA MEMBRANE LIMITANTE INTERNE ?



## **CHAPITRE III : ÉTUDE**

- I. Matériel
- II. Méthode
- III. Résultats
- IV. Discussion
  - A. ICG : adjuvant Chirurgical
  - B. Inoffensif au toxique ?
  - C. Que colore l' ICG ?
- V. Conclusion

## **ANNEXES :**

- I. Différentes appellations des membranes épitréiniennes dans la littérature.
- II. Principales étiologies des membranes épitréiniennes secondaires.
- III. Vues peropératoires.
- IV. Tableaux statistiques.
- V. Images en microscopie confocale.
- VI. Microscopie optique

**MEMBRANES EPIMACULAIRES  
ET ICG :**

**ETUDE EN MICROSCOPIE  
CONFOCALE**

## INTRODUCTION

Les membranes épimaculaires qu'elles soient primitives ou secondaires sont caractérisées par la prolifération d'un tissu fibrocellulaire à la surface de la macula. Les membranes idiopathiques touchent 2 à 6 % de la population générale (87), sans prédominance de sexe (16). C'est une pathologie de plus en plus fréquente en rapport avec le vieillissement de la population : elle atteindrait 13 % des sujets de plus de soixante ans (16,87).

Douées de propriétés contractiles plus ou moins marquées, elles entraînent des modifications anatomiques du pôle postérieur responsables d'un syndrome maculaire parfois très invalidant. Si les caractéristiques cliniques, les facteurs de bon pronostic et les indications chirurgicales sont actuellement bien codifiées, la physiopathologie des membranes épimaculaires reste floue. Cette étude fait la synthèse des connaissances actuelles sur leur pathogénie.

Le traitement chirurgical des membranes épimaculaires est devenu une des causes les plus fréquentes de chirurgie vitréo-rétinienne. Les progrès techniques ne cessent d'améliorer la qualité du geste chirurgical. C'est dans cet esprit que s'est développée l'utilisation de colorants vitaux comme adjuvants au pelage de la membrane limitante interne bordant les trous maculaires.

Le but de notre étude est d'évaluer l'intérêt de l'utilisation per-opératoire du vert d'indocyanine dans la chirurgie des membranes épiténiennes et de faire une analyse descriptive des différents tissus prélevés en microscopie confocale pour étayer les différentes hypothèses physiopathologiques.

# **CHAPITRE I**

## **RAPPELS ANATOMIQUES**

# I. LA RETINE

## A. STRUCTURE GENERALE

La description histologique de la rétine est classiquement présentée comme une succession de dix couches associant les neuf couches de la rétine sensorielle à l'épithélium pigmentaire (21,6,67). On distingue, de la choroïde en dehors vers le corps vitré en dedans :

### 1. L'épithélium pigmentaire (EP) :

Epais de 10 à 20  $\mu\text{m}$ , l'EP est constitué d'une couche unistratifiée de cellules unies entre elles par des jonctions serrées imperméables (« zonula occludens » et « zonula adherens » ), réalisant la barrière hémato-oculaire externe. Il repose sur la membrane de Bruch et la chorio-capillaire. Les échanges métaboliques se font de la chorio-capillaire vers les photorécepteurs par voie transcellulaire grâce à la pinocytose. Dans le sens inverse, ces cellules éliminent les résidus des articles externes issus de la photo-transduction par phagocytose.

Avec l'âge, l'épithélium pigmentaire se charge progressivement en lipofuscine.

Il possède de nombreuses fonctions : stockage de la vitamine A, production de glycosaminoglycanes entourant les photorécepteurs, phagocytose des articles externes des photorécepteurs, absorption des rayons ultraviolets.

**2. La couche des photorécepteurs (40  $\mu\text{m}$ ) :**

Elle est constituée des segments externes des cônes et des bâtonnets.

**3. La limitante externe :**

Elle est formée des complexes de jonction entre les cellules de Müller et les segments internes des photorécepteurs.

**4. La granuleuse externe (ou nucléaire externe) :**

Elle regroupe les 9 à 10 couches de corps cellulaires de photorécepteurs superposés.

**5. La plexiforme externe :**

De 2 $\mu\text{m}$  en périphérie à 50 $\mu\text{m}$  à la fovéa, elle se divise en trois régions synaptiques entre les photorécepteurs (premier neurone) et les cellules bipolaires (deuxième neurone) :

-Pré-synaptique : segments internes des photorécepteurs,

-Synaptiques : axones des cellules visuelles – dendrites des cellules bipolaires,

-Post-synaptique : dendrites des cellules bipolaires et horizontales

**6. La granuleuse interne : (nucléaire interne)**

Elle est composée des noyaux des cellules bipolaires, des cellules de Müller, des cellules horizontales, des cellules amacrines et interplexiformes (soit près de quatre à dix couches cellulaires). Mesurant de 35 à 40  $\mu\text{m}$ , elle est plus mince en périphérie.

**7. La plexiforme interne : (20 à 30  $\mu\text{m}$ )**

C'est une zone de synapses entre les axones des cellules bipolaires et les dendrites des cellules ganglionnaires et amacrines ; elle est absente à la fovéola.

**8. La couche des cellules ganglionnaires :**

Elle regroupe les corps cellulaires des cellules ganglionnaires séparées les unes des autres par les expansions des cellules de Müller et la neuroglie. Elle représente le troisième neurone dont l'axone s'étend jusqu'au corps genouillé latéral.

**9. La couche des fibres optiques :**

Ce sont les axones non myélinisés des cellules ganglionnaires. Ils convergent vers la papille en faisceaux, entourés des expansions des cellules de Müller.

**10. La limitante interne :**

C'est l'élément le plus interne de la rétine : véritable membrane basale sur laquelle repose l'apposition ininterrompue des pieds des cellules de Müller. (Elle fait l'objet d'une description détaillée plus avant).

## **B. PARTICULARITÉ DE LA RÉGION MACULAIRE**

**(78,88)**

Pour assurer une acuité visuelle maximale, la région maculaire (1500  $\mu\text{m}$  de diamètre) possède une structure différente de la périphérie rétinienne. Elle se distingue par une moindre épaisseur liée à l'absence des couches rétiniennes les plus internes. L'épithélium pigmentaire y est plus fortement pigmenté et le pigment xanthophylle lui confère sa coloration jaune.

La région fovéolaire, 350  $\mu\text{m}$  de diamètre, est remarquable par son extrême finesse (130  $\mu\text{m}$ ). En effet, le pigment xanthophylle y est absent, tout comme les couches internes de la rétine (la couche des fibres optiques, la couche des cellules ganglionnaires, la couche plexiforme interne).

Dans ses cinquante microns centraux, la couche des photorécepteurs n'est plus formée que de cônes, particuliers par leur morphologie et leur orientation. Leurs segments internes sont séparés par les expansions des cellules de Müller. La couche nucléaire externe est par contre plus épaisse qu'en périphérie puisque s'y entassent tous les noyaux des très nombreux cônes de la fovéola. Leur axone, déjeté latéralement, est orienté parallèlement à la surface de la rétine.

En plus d'une architecture histologique particulière, l'organisation ultrastructurale de cette région expliquerait sa spécialisation physiologique : chaque cône n'est relié qu'à une cellule bipolaire, qui elle-même n'est reliée qu'à une seule cellule ganglionnaire. La transmission du stimulus visuel est ainsi maximale au travers d'un tissu aussi fin que possible, dépourvu de réseau vasculaire.



## II. LE TISSU DE SOUTIEN

Les cellules de Müller avec les astrocytes et la microglie constituent le tissu glial rétinien. Ce sont de grandes cellules qui traversent verticalement toute l'épaisseur du neuro-épithélium selon une orientation radiaire, des photorécepteurs jusqu'à la membrane limitante interne.

Elles ont une structure complexe avec de nombreuses expansions cytoplasmiques. Leur noyau se situe dans la couche nucléaire interne, leurs extensions cellulaires horizontales remplissent les espaces laissés libres par les cellules neuronales. La membrane limitante externe n'est en fait que la juxtaposition des jonctions intercellulaires étroites et serrées (« zonula occludens ») entre les expansions des cellules de Müller et les segments internes des photorécepteurs.

Les cellules de Müller ne jouent pas seulement un rôle de soutien passif. Elles interviennent dans l'homéostasie de la matrice extracellulaire assurant le bon développement de la fonction visuelle.

Elles assurent (81) :

- l'équilibre ionique (riches en  $K^+$ , ces cellules éliminent l'excès d'ions potassium libérés dans l'espace extracellulaire au cours de l'activité neuronale),
- l'équilibre acide-base en tamponnant les ions  $HCO_3^-$  produits par l'activité neuronale,
- la régulation de la concentration des neuromédiateurs dans l'espace synaptique (GABA, dopamine, adrénaline, glutamate, acétylcholine),
- l'expression de récepteurs membranaires aux facteurs de croissance,
- le métabolisme glucidique de la rétine en stockant le glycogène intracellulaire.

Il existe 2 autres types des cellules gliales (89) :

- les astrocytes : ils n'existent que dans la couche des fibres optiques intimement liés aux vaisseaux.
- la microglie : (macrophages de la rétine) on la retrouve dans la couche des fibres optiques, dans les couches plexiformes interne et externe.
- Par contre, les oligodendrocytes du système nerveux central sont absents des différentes couches rétinienne.

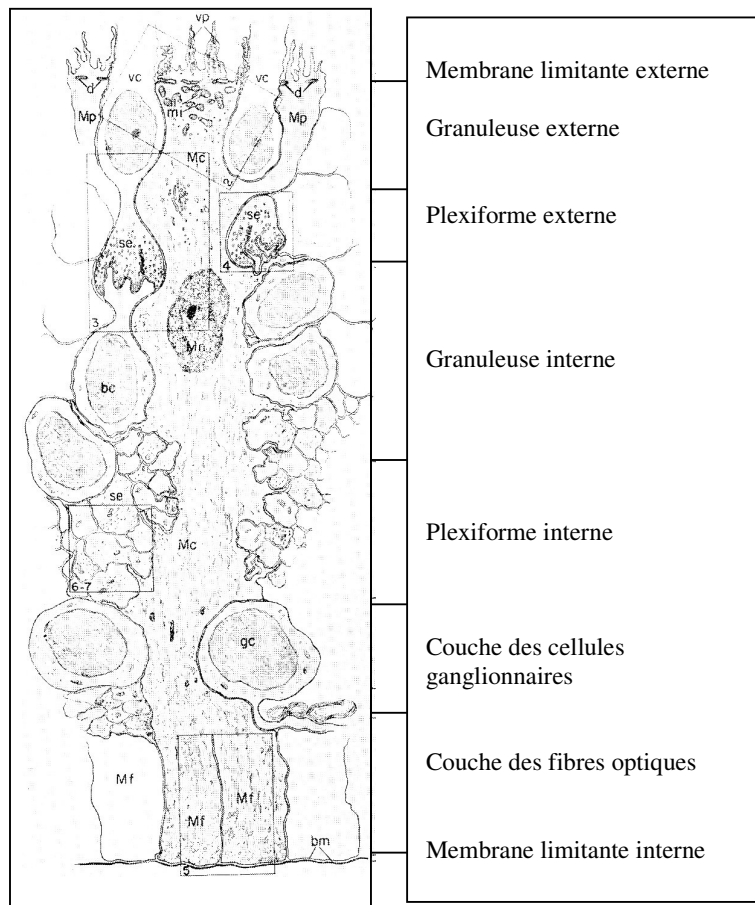


Figure1 : Représentation d'une cellule de Müller (Mc : cytoplasme, Mf : pieds, Mn : noyau).

d'après Pouliquen Y, in Atlas d'histologie et d'ultrastructure du globe oculaire.

Masson . Paris. 1969 :120

### III. LA JONCTION VITREO-RETINIENNE

#### A. LA MEMBRANE LIMITANTE INTERNE

La membrane limitante interne (MLI) correspond à une structure fine, cellophane, analysée en microscopie électronique après chirurgie vitréo-rétinienne.

- *STRUCTURE HISTOLOGIQUE :*

Les travaux originaux de FOOS (26,27,28), repris par BALAZS (2) ont abouti à la description d'une véritable membrane basale de structure laminaire: la lamina rara et la lamina densa .

- La lamina rara, la plus fine des deux couches est d'épaisseur constante (0,03 à 0,06 $\mu$ m) (91). Elle correspond à la juxtaposition ininterrompue des pieds des cellules de Müller et présente donc une surface très irrégulière aux dépend des cellules sous-jacentes.

- La lamina densa, d'épaisseur variable, est visible en microscopie électronique après fixation de métaux lourds. Elle est constituée par l'entrelacement de filaments de collagène IV au sein d'une matrice extracellulaire de muco - polysaccharides dont la laminine et la fibronectine (55,80).

Sa face interne, en contact intime avec la hyaloïde postérieure formée par la condensation des fibrilles vitréennes de collagène II, est parfaitement lisse (29).

- *VARIATIONS TOPOGRAPHIQUES :*

La membrane limitante interne possède une épaisseur variable selon sa topographie (29) : fine à la base du vitré (50 nm), elle s'épaissit progressivement pour mesurer 306 nm à l'équateur et 1887 nm au pôle postérieur (38). Elle redevient extrêmement fine (10 à 20 nm) en regard de la fovéa où la densité des cellules de Müller décroît significativement (112).

Au niveau de la papille, elle subit autre une modification importante.

Elle s'amincit brutalement à 50 nm et devient la membrane basale des cellules gliales du nerf optique. Elle est alors appelée membrane limitante interne de ELSCHNIG (46). Son centre, le « ménisque central de Kuhnt », est uniquement constitué de glycosaminoglycanes (sans collagène) et ne mesure plus que 20 nm.

Selon BALAZS, cette structure particulière ( épaisseur et biochimie ) expliquerait entre autre la fréquence des proliférations cellulaires provenant de la papille dans les rétinopathies diabétiques et les membranes épirétiniennes (2)

Autre particularité : autour des vaisseaux rétiniens, la limitante interne amincie permet l'ancrage des fibrilles vitréennes autour des gros vaisseaux (28).

- *VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES :*

FOOS (29) décrit les modifications de MLI avec l'âge comme un remaniement dégénératif.

Avec le vieillissement, la membrane limitante interne se modifie biochimiquement. Les systèmes jonctionnels unissant les pieds des cellules de Müller se relâchent. Ce qui entraîne l'envahissement progressif des espaces intercellulaires par les cellules gliales ou par des fibrilles vitréennes de

collagène. Ces cellules en synthétisant une nouvelle matrice extracellulaire créent un épaissement de la membrane limitante interne.

Dans le même temps, entre en jeu un autre phénomène physiologique : la modification du vitré. Les adhérences vitréennes se fragilisent et permettent la séparation du cortex postérieur vitréen de la membrane limitante interne.

## B. LE VITRÉ POSTÉRIEUR

Le cortex vitréen postérieur correspond à la membrane hyaloïde postérieure que

GASS définit cliniquement comme une fine couche de condensation du vitré.

Elle ne devient visible au biomicroscope qu'après sa séparation de la membrane limitante interne. (33)

### ▪ *ULTRASTRUCTURE:*

Ses deux principaux constituants extracellulaires sont le collagène et l'acide hyaluronique.

Ils composent un réseau tridimensionnel en nid d'abeilles où l'acide hyaluronique

remplit les espaces libres entre les fibrilles de collagène (98).

Le collagène est majoritairement représenté par du collagène natif de type II de 10 à 25 nm de diamètre (90)

Le cortex vitréen postérieur est composé de fibres de collagène densifiées. Son épaisseur est d'environ 100 µm sauf au niveau maculaire il est très aminci (88).

Deux contingents cellulaires ont été identifiés au niveau du cortex vitréen : les hyalocytes et les fibroblastes. Leurs origines et leurs fonctions restent discutées (92).

Les hyalocytes forment une monocouche de cellules ovalaires contenant de nombreux granules lysosomiaux. Ils pourraient avoir une activité de synthèse de l'acide hyaluronique, de glycoprotéines, de collagène mais aussi une activité phagocytaire.

Les fibroblastes moins nombreux (environ 10 % de la population cellulaire vitréenne) prédominent à la base du vitré et proche de la papille. Ils seraient impliqués dans la synthèse du collagène, notamment dans certaines situations pathologiques (91).

Pour SEBAG, ces cellules sont les premières exposées aux stimuli migratoires et mitotiques. Leur réponse joue ainsi un rôle dans la physiopathologie des désordres prolifératifs de l'interface vitréo-rétinienne (92).

▪ *LES ADHÉRENCES PHYSIOLOGIQUES VITRÉO-RÉTINIENNES:*

Certaines régions de l'interface vitréo-rétinienne se distinguent par des zones d'adhérence marquée entre le cortex vitréen postérieur et la MLI (39).

- \* Aire péripapillaire : les adhérences du vitré au tissu glial épipapillaire du nerf optique sont très fermes. Elles prédominent dans sa région nasale.
- \* Aire maculaire : au niveau du clivus les adhérences sont maximales.
- \* Aire paravasculaire : une solution de continuité ou un extrême amincissement de la membrane limitante interne permettrait aux fibrilles vitréennes de s'insinuer dans l'épaisseur de la rétine interne (28) et de faire corps avec les parois vasculaires des vaisseaux rétiniens (92). Cette particularité explique qu'il existe parfois des hémorragies rétiniennes lors des DPV symptomatiques.

La nature exacte de cette relation entre le vitré et la MLI restent méconnue. FOOS décrit en microscopie électronique des « plaques d'attachement » entre le vitré et la MLI. Ce sont des zones d'épaississement focal de la MLI, en rapport avec une densification fibrillaire intra-cytoplasmique en regard des fibrilles de collagène. Ces plaques ont une répartition particulière : elles sont décrites à la base du vitré, à l'équateur, à la fovéa, mais pas au reste du pôle postérieur (29).

Elles pourraient correspondre à des hémi-desmosomes amarrant les cellules de Müller à la MLI (26). La finesse de la membrane limitante interne et la présence de ces hémi-desmosomes au niveau de la fovéa pourrait expliquer la prédisposition de cette région au changement induit par les tractions vitréennes.

### C. LE DECOLLEMENT POSTERIEUR DE VITRE (DPV)

- DÉFINITION:

La définition du DPV est clinique : apparition d'un espace optiquement vide entre la hyaloïde postérieure et la rétine. Cette séparation se produit entre le cortex vitréen et la MLI mais probablement à différents niveaux (dans le cortex vitréen, entre le cortex et MLI, dans la MLI ?) . La hyaloïde postérieure ne devient une entité cliniquement observable qu'après cette séparation vitréo-rétinienne.

La classification d'Eisner (23) différencie les DPV rhégmato-gènes idiopathiques ou séniles, des DPV arhégmato-gènes secondaires à une pathologie entraînant une rétraction centripète du vitré. Le DPV qui survient dans les yeux atteints de MEM idiopathique est un DPV rhégmato-gène idiopathique. Il est l'aboutissement d'une cascade d'événements dont le point de départ est encore mal connu.

- MODIFICATION DU VITRÉ : (30,35,7)

Avec l'âge, apparaît une dégénérescence vitréenne sous la forme d'une liquéfaction, le plus souvent centrale. Elle se traduit par l'apparition de lacunes optiquement vides souvent bordées d'agrégats fibrillaires tortueux et blanchâtres (floculation du vitré) (92). Ces poches peuvent communiquer entre elles (61) .

Sur le plan moléculaire, il se produit une dissociation du complexe tridimensionnel acide hyaluronique - collagène : les molécules d'acide hyaluronique sont regroupées dans la cavité vitréenne et les fibrilles de collagène se rassemblent pour former des agrégats denses macroscopiquement



visibles. On ne connaît pas le facteur déclenchant de ce processus (formation de radicaux libres ? , l'augmentation de la température par focalisation des rayons lumineux ?).

- LA CONSTITUTION DU DPV (30,37,7)

Ces modifications moléculaires entraînent un état vitréen instable. A partir d'un certain seuil de liquéfaction (environ 50%) ou à la suite d'un traumatisme, il apparaît un trou pré-papillaire et/ou prémaculaire à travers le(s)quel(s) passe(nt) le vitré liquéfié, créant ainsi un espace entre le cortex vitréen postérieur et la MLI (30).

Pour Gass le début du DPV est le plus souvent prémaculaire (35,32).

Les fibrilles de collagène du cortex vitréen, perpendiculairement insérées sur la membrane basale des cellules de Müller, se réorganisent parallèlement au plan de la rétine en une membrane dense visible au biomicroscope : la hyaloïde postérieure. Ce clivage peut se produire à différentes profondeurs de l'interface : dans le cortex vitréen (vitréoschisis), entre le cortex vitréen et la membrane limitante interne, dans membrane limitante interne.

Le vitré se sépare progressivement de la rétine au rythme du passage du vitré liquéfié vers l'espace rétro-hyaloïdien. L'anneau de Weiss, (orifice prépapillaire entouré d'un anneau fibrogial) est visible en avant de la papille au début du DPV. Lorsque qu'il devient complet, le vitré supérieur s'affaisse. L'anneau prépapillaire se retrouve alors en position horizontale.

Le DPV est complet si la séparation cortex vitréen – MLI se poursuit jusqu'à la base du vitré . Il peut-être incomplet de façon transitoire s'il existe des zones d'adhérences vitréo-rétiniennes anormales.

La visualisation de l'anneau de Weiss signe habituellement un DPV complet, l'anneau prémaculaire beaucoup plus discret est rarement recherché. Il pourrait parfois être confondu avec l'anneau prépapillaire.(61)

- PRÉVALENCE DU DPV :

La prévalence du DPV augmente avec l'âge. BRASSEUR (7) rapporte les résultats de différentes études réalisées.

L'étude autopsique de FOOS retrouve 22 % de DPV entre 60 et 69 ans puis 60 % après 70 ans sur 1572 yeux. (29)

L'analyse échographique de 220 yeux emmétropes par PERICHON (85) retrouve une fréquence de DPV complet progressivement croissante avec l'âge ; débutant dès cinquante ans pour atteindre 58 % après quatre-vingts ans. Ce qui paraît nettement inférieur au pourcentage des études cliniques et anatomiques.

Selon Brasseur (7) les résultats cliniques sont probablement surestimés. Un certain nombre de diagnostics positifs seraient erronés : la poche précorticale de Kishi et Shimizu pouvant être confondue avec un DPV complet (61).

Après une présentation des connaissances actuelles sur les membranes épirétiniennes et leur pathogénie, nous vous présentons notre étude en microscopie confocale des membranes épirétiniennes et des membranes limitantes internes recueillies après chirurgie à l'aide du vert d'indocyanine.

## **CHAPITRE II**

### **LES MEMBRANES EPIMACULAIRES**

# I. GÉNÉRALITÉS

## A. HISTORIQUE : (17)

C'est IWANOFF en 1865 qui aurait publié la première description anatomopathologique d'une MER secondaire inflammatoire.

En 1946, DUKE-ELDER considérait ces MER comme des proliférations fibrocellulaires issues des parois des vaisseaux rétiniens.

Ce n'est qu'en 1967 que MAUMENEE (72) décrit cliniquement une MER et que JAFFE individualise le syndrome de traction vitréo- rétinienne maculaire (54).

En 1970, TANENBAUM introduit l'appellation "macular pucker" en décrivant l'aspect particulier des MEM succédant à un décollement de rétine.

En 1971 ROTH et FOOS décrivent la première classification anatomopathologique (87).

En 1976 MACHEMER (69) publie le premier pelage chirurgical d'une MER secondaire à un décollement de rétine, ouvrant la voie à de nombreuses études histologiques en microscopie électronique et en immunomarquage.

Cependant, elles n'ont toujours pas abouti à un consensus quant à la physiopathologie exacte des MER.

En 1977, GASS introduit la première classification clinique selon trois stades de gravité (34).

## B. CLINIQUE ET CLASSIFICATION

Regroupées sous de multiples appellations dans la littérature (annexe 1), les MEM sont caractérisées par la prolifération d'un tissu fibrocellulaire avasculaire se développant à la surface de la limitante interne de la région maculaire. Elles sont soit primitives (idiopathiques) soit secondaires à de diverses affections (annexe 2).

Leurs propriétés rétractiles sont responsables de syndrome maculaire s'aggravant progressivement.

GASS puis Mac LEOD (75) ont proposé une classification en trois grades évolutifs :

0 = simple reflet brillant

1 = froissement rétinien superficiel

2 = plissement de pleine épaisseur

Cette classification est actuellement peu utilisée car elle n'est pas en adéquation avec la sévérité des signes cliniques. Une membrane cellophane s'accompagnant d'une constriction maculaire peut-être aussi symptomatique qu'un plissement superficiel .

De plus, elle ne prend pas en considération les différentes formes cliniques.

Elle peut permettre de suivre l'évolution de cas cliniques, mais pas de poser l'indication opératoire.

En dehors de rares cas d'amélioration spontanée (2 %) (40,75,76), l'évolution se fait vers une rétraction plus ou moins lente des couches internes rétiniennes provoquant une baisse d'acuité visuelle invalidante. La sanction thérapeutique est alors chirurgicale permettant d'obtenir une amélioration de l'acuité visuelle d'au moins deux lignes de Snellen dans 70 à 90 % des cas selon les auteurs (36).

## II. PATHOGENIE

Si les caractéristiques cliniques, les facteurs de bon pronostic et les indications chirurgicales sont actuellement bien codifiées, la physiopathologie des MEM reste floue.

Différentes études histologiques et ultrastructurales ont souvent abouti à des résultats contradictoires et plusieurs théories physiopathologiques ont été proposées.

### A. ASPECT HISTOLOGIQUE

#### ▪ Les composants cellulaires

Les études nécropsiques ou sur yeux énucléées [ ROTH et FOOS 1975 (87), BELLHORN (5) 1975 et CLARKSON 1977 (16)] ont permis de caractériser histologiquement différents constituants cellulaires entourés d'une matrice extracellulaire fibreuse, en contact étroit la MLI.

Avec l'avènement de la microchirurgie vitréo-rétinienne les analyses ultrastructurales de MER prélevées in vivo se sont développées. L'identification des différentes populations cellulaires utilise des critères morphologiques ultrastructuraux en microscopie électronique (58,59,70,78) et des critères immunohistochimiques(50,51). Elles ont été complétées de recherches sur des modèles expérimentaux [animaux ou cultures cellulaires (63,73,103,104) ].

Malgré les multiples études histologiques publiées et les progrès des techniques d'immunomarquage, il n'y existe toujours pas de certitude quant aux différents composants cellulaires.

Cependant la plupart des auteurs retrouvent assez constamment cinq types cellulaires différents.

a) les cellules gliales :

Elles regroupent les astrocytes fibrillaires et les cellules de Müller, reposant sur une membrane basale. Elles sont habituellement marquées par les anticorps anti-GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein). Elles sont considérées comme essentielles dans la formation des MER. BELLHORN 1975 (5) et CLARKSON 1977 (16) soulignent leur importance dès les premières études anatomiques, FOOS 1977 (27) les retrouvent majoritaires dans les MER primitives ce qui est confirmé par d'autres auteurs (RODRIGUES 1981 (86), KAMPIK 1981(59), HISCOTT 1984 (51) )

b) les cellules épithéliales pigmentaires :

Ce sont les travaux de SMIDDY en 1989 qui ont lancé la controverse. En effet, elles seraient pour lui, prédominantes dans 75 % des MEM idiopathiques (96) alors qu'elles semblaient constituer la part essentielle des membranes secondaires et des proliférations vitréo-rétiniennes [ GREEN 1979 (38), DUCOURNAU 1996 (22), CHEFRAN 1988 (14)]. Cependant, il n'explique pas le cheminement de ces cellules vers l'interface vitréo-rétinienne.

c) les fibrocytes-like et myofibroblastes :

Ce sont des cellules moins différenciées. Les fibrocytes-like sont des cellules fusiformes non polarisées ne reposant pas sur une membrane basale. Leur activité principale serait la synthèse de collagène. Elles seraient présentes dans 80 % des MER (96,56,58). Leur origine est inconnue et différentes hypothèses ont été proposées: origine sanguine à partir de péricytes, origine métaplasique à



partir des cellules gliales ou des cellules de l'épithélium pigmentaire, origine vitréenne à partir des hyalocytes du cortex postérieur.

Les myofibroblastes se distinguent par la présence de microfilaments d'actine dans leur cytoplasme qui leur confèrent des propriétés contractiles (58,114).

d) Les macrophages.

Les macrophages se distinguent des autres cellules par leur contenu riche en lysosomes. Ils sont principalement identifiés au niveau des proliférations vitéo-rétiniennes (4,108), des membranes idiopathiques complexes (58). Leur présence au niveau des MER idiopathiques correspondrait à des cellules gliales modifiées. Expérimentalement, l'injection de sang autologue dans la cavité vitréenne provoque l'apparition d'une MER principalement formée de macrophages et de cellules gliales dans les premiers stades du développement. Ils disparaissent ensuite au profit des cellules gliales. ( Ils pourraient avoir un rôle dans l'initiation et le développement des membranes) (63).

e) Conclusion :

Les deux contingents cellulaires prédominants sont les cellules gliales et des cellules de l'EP. Des désaccords résident toujours sur la prédominance de l'une par rapport à l'autre.

En fait l'identification cellulaire précise au moyen de critères morphologiques en microscopie électronique est difficile (59,104). Plusieurs auteurs ont démontré la capacité métaplasique de ces cellules et VINORES insiste sur l'absence de spécificité des marqueurs immunohistochimiques utilisés pour reconnaître des cellules se développant hors de leur milieu naturel, au contact du vitré (102,103,104). Par exemple, les cellules de l'EP pourraient se différencier en fibroblastes ou en myofibroblastes (102), les cellules de Müller prendre une morphologie de cellule épithéliale (93).

VINOIRES a qualifié ce phénomène de « plasticité phénotypique » (104) . Elle explique les résultats controversés de la littérature sur l'origine cellulaire des MEM, en plus de leur hétérogénéité clinique et de la variabilité des prélèvements selon le geste chirurgical réalisé (22).

Pour lever ces confusions, DUCOURNAU a donc effectué une étude avec un double marquage immunohistochimique sur des prélèvements tissulaires définis par leur aspect peropératoire en distinguant pendant la chirurgie : la hyaloïde postérieure, MER et la MLI. Selon elle, les populations cellulaires prédominantes seraient fonction de l'étiologie : les cellules gliales dans les membranes idiopathiques, les cellules de l'épithélium pigmentaire après décollement de rétine (22).

Ces résultats étayaient l'hypothèse d'une migration transrétinienne possible des cellules de Müller dans les MEM primitives et des cellules de l'EP au travers des déchirures au cours des MEM secondaires, sous l'action des facteurs de croissance et des macromolécules de la matrice extracellulaire.

#### ▪ **la matrice extracellulaire**

##### a) Les macromolécules

Les cellules sont entourées d'une matrice extracellulaire constituée de collagène et de diverses macromolécules. Les plus fréquemment identifiées sont :

- la fibronectine :

cette glycoprotéine existe sous 2 formes. La première, est soluble dans le plasma. Par son activité chimiotactique, elle stimule la migration des fibroblastes vers la zone lésionnelle. La seconde, insoluble, est synthétisée par

les fibroblastes comme le procollagène auquel elle se mêle. (18) Cette forme moléculaire a d'abord été mise en évidence au sein des membranes de PVR où

sa production est locale (42) puis dans les MER (41,50,75,82). Elle jouerait un rôle majeur dans l'adhésion des cellules au collagène environnant ainsi que dans la cohésion intercellulaire des membranes. Son interaction transmembranaire avec les protéines du cytosquelette des fibroblastes-like qui la synthétisent in situ constitue selon HISCOTT « une unité contractile » (50). Cette unité contractile confère à la MEM ses propriétés de rétraction.

-la thrombospondine (49)

-la vitronectine (28)

-la laminine : également incriminée dans le processus d'adhésion, différenciation et migration cellulaire.

Ces molécules interagissent avec plusieurs facteurs de croissance pour stimuler la migration cellulaire, comme le PDGF (platelet derived growth factor) dont, les propriétés chimiotactiques sur les cellules de l'EP et les cellules gliales ont été les mieux étudiées (10,11).

Plusieurs études expérimentales ont suggéré une synthèse autocrine et paracrine du PDGF par les cellules de l'EP, induisant leur prolifération (105). Le blocage de leurs récepteurs membranaires diminuerait leur multiplication in vitro (13). L'importance de ces facteurs de croissance (PDGF, bFGF, EGF(66), TGFbeta(97)) modulant la prolifération cellulaire de l'EP a été encore récemment souligné (12,60).

Il est évident qu'une meilleure compréhension des interactions de ces molécules dans le développement des MEM pourrait aboutir à une thérapeutique médicale ou à un adjuvant chirurgical permettant de réduire les récurrences. Ce type d'agent antiprolifératif a d'ailleurs déjà été utilisé pour lutter contre la PVR (109).

#### b) Le collagène

Les études immunohistochimiques des MEM prélevées chirurgicalement ont permis de distinguer quatre types de collagènes différents (22):

- le collagène II correspondant aux fibrilles de collagène vitréen (82),
- le collagène IV constituant des membranes basales donc de la MLI (82),
- les collagènes I et III représentent du collagène néoformé. Ce collagène se distingue du collagène de type II par ses fibres de diamètre plus important. Sa synthèse est attribuée aux cellules gliales de la MEM ( 21).

### III. HYPOTHÈSES PHYSIOPATHOLOGIQUES

Depuis la première description de MER par JAFFE en 1967 de nombreuses hypothèses physiopathologiques ont vu le jour sans que la séquence exacte des événements aboutissant à la formation des MER puisse être expliquée.

Cependant il est certain qu'avec l'âge l'adhésion entre le vitré et la rétine diminue progressivement pour aboutir au DPV. La relation chronologique entre le DPV et l'apparition des MER idiopathiques chez les sujets âgés a été fortement suggérée par les études prospectives de WISE en 1975 et de WIZNIA en 1986 (110,111). Mais quel est son rôle exact ?

Deux principales théories ont été proposées dans la genèse des membranes épirétiniennes : l'une d'origine rétinienne, l'autre d'origine vitréenne.

#### I. THÉORIE RÉTINIENNE

C'est FOOS qui propose la première théorie physiopathologique. Après observation histologique de déhiscences de la MLI, il postule sur l'origine rétinienne des MER idiopathiques.

C'est l'hypothèse la plus communément admise.

Ses études complémentaires de la jonction vitréo-rétinienne en regard des gros vaisseaux rétiniens retrouvent de petites ruptures de la MLI. Elles seraient de taille inférieure à dix microns et se développeraient à trois conditions : une

MLI fine, une dégénérescence de la surface rétinienne liée à l'absence relative de cellules de Müller, et la présence de macrophages. À partir de ces déhiscences se développeraient des incarcérations de fibres vitréennes réalisant une réelle adhérence du vitré à la rétine.

Ces tractions vitréo-rétiniennes lors de la constitution du DPV pourraient être responsables de ruptures de la membrane limitante interne et former des hiatus par lesquelles les cellules gliales pourraient migrer et proliférer la face interne de la rétine en réponse à cette agression. Ce processus de réparation tissulaire serait le plus souvent situé dans les zones où la MLI est fine, comme en périfovéolaire et autour des gros vaisseaux (5,27,28,87).

Cette théorie associe donc la notion d'une traction mécanique lors du DPV à la rupture de la MLI. A travers ces fractures, des cellules gliales rétiniennes pourraient migrer et proliférer à la façon d'un processus de cicatrisation.

Pour les MEM secondaires aux DR, ce sont les cellules de l'EP qui pourraient migrer conjointement aux cellules gliales sous l'action de la fibronectine et des facteurs de croissance au travers de déhiscences intéressant toute l'épaisseur rétinienne.

Cependant cette théorie n'explique pas la faible incidence de récives post-chirurgicales de MER alors que la MLI est le plus souvent emportée par le pelage, et les nombreux cas de MER se développant en absence de DPV (selon les séries entre 15 et 8 %)(1,48,93).

## II. THÉORIE VITRÉENNE

Certains auteurs ont alors opposé une seconde théorie fondée sur une origine vitréenne des cellules composant les MER. Ils interprètent différemment le lien

entre le DPV et l'apparition d'une MER . Elle expliquerait leur développement en absence d'un DPV complet.

JAFFE suggère le développement des MEM à partir d'adhérences vitréo-rétiniennes persistantes lors des DPV incomplets (54) et GASS supporte l'hypothèse d'une participation cellulaire du vitré au développement des MEM. Une partie du cortex vitréen postérieur resterait adhérent à la membrane limitante interne après la survenue d'un pseudo-DPV. Ce cortex prémaculaire résiduel rétractile serait le support d'une prolifération cellulaire secondaire.

La théorie de KISHI rejoint partiellement la théorie de GASS. Une première étude réalisée en microscopie électronique à balayage sur le pôle postérieur de 59 yeux prélevés post-mortem et ayant un DPV complet retrouvait 44 % de résidus vitréens maculaires sous trois formes anatomiques : une membrane de collagène de 500 microns de diamètre adhérent à la fovéa, un anneau sur la marge fovéale, une membrane adhérente à la marge de la fovéa rétractée, entraînant une diminution du diamètre de l'aire maculaire (61). Ces résidus correspondaient à du cortex vitréen postérieur et avaient des similitudes morphologiques avec des MEM. Associé à SHIMIZU en 1994, il analyse la jonction vitréo-rétinienne de 71 yeux atteints de MEM idiopathiques. Il retrouve l'existence d'un défaut ovale de la hyaloïde postérieure, prémaculaire, dont les contours et la taille de 5 diamètres papillaires correspondaient à celle de la membrane dans 65 % des yeux (62). L'existence d'une poche liquidienne pré-corticale maculaire sans DPV complet suffirait au développement d'une MEM dont le cortex vitréen pourrait être le constituant essentiel ; hypothèse confirmée par HIKICHI (47) qui retrouve une association statistiquement significative entre la présence d'un anneau prémaculaire et la survenue d'une MEM lors d'une étude prospective sur 106 yeux.

Cette théorie associe le DPV partiel à une prolifération cellulaire d'origine vitréenne sans participation de la membrane limitante interne.

### III. SYNTHÈSE

Ces deux hypothèses suggèrent que l'élément princeps du développement des membranes épitréiniennes est l'agression de la surface rétinienne par des tractions vitréennes et débattent chacune de l'origine des constituants cellulaires.

Pour GRIERSON la formation d'une MEM est l'équivalent d'une cicatrisation rétinienne. On y retrouve effectivement des phénomènes de migration, de prolifération et de contraction cellulaire (41).

Cette cicatrisation complexe combine le plus souvent une gliose et une fibrose. La gliose du tissu neuronal fait intervenir les cellules de Müller et les astrocytes. Elle se caractérise par une activation, une migration et une prolifération de cellules entraînant peu de rétraction tissulaire.

Par contre, la fibrose se caractérise par la présence de cellules inflammatoires (plutôt d'origine sanguine), de cellules de l'épithélium pigmentaire se comportant alors comme des fibroblastes, qui pourraient donc synthétiser une importante quantité de néocollagène et induirait une contraction tissulaire beaucoup plus marquée. Ceci explique encore une fois l'extrême variabilité clinique et histologique des MEM étudiées dans la littérature.

Les études de DUCOURNAU établissent une corrélation anatomoclinique et reprennent les premières classifications de FOOS (27), TRESE (101), et OKADA (82). Il démontre, lui aussi, qu'il existe une composante pathologique commune à toutes les membranes idiopathiques : la gliose de la MLI.

Cette gliose correspond à l'augmentation des filaments protéiques contenus dans le cytoplasme des cellules gliales (astrocytes et cellules de Müller). Lors de cette gliose on observe deux phénomènes : une hypertrophie cellulaire (les cellules gliales préexistantes s'enrichissent de filaments gliaux). La fibrose serait, plutôt une hyperplasie cellulaire (multiplication des cellules gliales

préexistantes) induisant la formation de MEM plus épaisses, multistratifiées, riches en cellules et en néocollagène.

Cette hypothèse rejoint donc la théorie originelle rétinienne de FOSS.

La séquence des événements aboutissant à la formation d'une MER semble donc être la suivante :

-stimulus initial toujours méconnu (micro déchirure de la MLI par traction vitréenne ? , Inflammation ? , Souffrance cellulaire rétinienne d'origine dégénérative ou vasculaire ?)

-gliose réactionnelle le plus souvent prérétinienne à la surface de la MLI.

Cette gliose réactionnelle forme un support favorable à l'adhésion et la prolifération des cellules de l'EP ou de fibroblastes qui entraînent une fibrose par production de collagène. Ces cellules de l'EP pourraient parvenir à la surface vitréenne par migration à travers la rétine, probablement en empruntant des tunnels créés par les cellules de Müller au cours du processus de gliose dans les MEM primitives ou directement par les déchirures rétiniennes dans les MEM secondaires, sous l'effet stimulateur des différents facteurs de croissance et des glycoprotéines de la matrice extracellulaire.

#### IV. IMPLICATIONS THERAPEUTIQUES : INTERET DE L'ABLATION DE LA MLI ?

Dans cette hypothèse , la MLI remaniée jouerait un rôle primordial en tant que support de prolifération cellulaire.

Il semblerait donc logique de vouloir la supprimer.

Mais faut-il réellement procéder de la sorte ?

La revue de la littérature concernant les MEM est pauvre. Concernant la chirurgie des MEM et l'ablation de la MLI les différentes publications



existantes ne rapportent pas d'effet délétère (100). GAUDRIC (37) pense même que son ablation permet un meilleur déplissement maculaire.

On peut en revanche s'appuyer sur les études réalisées au sujet de la chirurgie des trous maculaires beaucoup plus nombreuses.

De récents éditoriaux résument les controverses actuelles (45,94).

Les dernières études rapportent une augmentation du taux de succès anatomique liée à l'ablation de la MLI réalisée grâce à sa visualisation par le vert d'indocyanine (ICG) (8,19,77,83,84,95).

L'ablation de la MLI autour du trou permettrait la suppression du support des tractions tangentielles et des cellules gliales différenciées en myofibroblastes contractiles. Elle stimulerait de nouvelles cellules gliales obturant le trou.

Mais ce sont des études rétrospectives, non randomisées, comparant leurs résultats à ceux de la littérature des années antérieures. Or les résultats anatomiques ou fonctionnels de la chirurgie rétinienne sont liés à l'expérience acquise au cours des années.

Seul MARGHIERO (71) compare 2 groupes (MLI pelée - MLI non pelée) sur une même période et conclue à l'absence de bénéfice de cette nouvelle technique. Mais les interventions ont été réalisées par 2 chirurgiens différents (un pour chaque groupe). Ces groupes n'étaient pas homogènes en terme classification.

SMIDDY (95) en réalisant une étude prospective avec un seul chirurgien montre un bénéfice anatomique à la l'ablation complète de la MLI ou à sa simple manipulation par rapport à une ablation partielle trop traumatisante ; mais il n'a pas de groupe contrôle sans aucune tentative de pelage. Il ne réalise pas de coloration, et les critères de reconnaissance du tissu prélevé sont macroscopiques peropératoires.

Chaque étude a ses écueils et montre la difficulté actuelle à prouver l'efficacité du pelage systématique de la MLI dans le traitement des trous maculaires .  
Cependant, il semble se dégager un consensus tacite sur l'intérêt de cette technique.

Elle ajoute une difficulté supplémentaire à l'acte chirurgical: l'identification per-opératoire de cette structure transparente sous l'éclairage d'une sonde endo-oculaire, ce qui allonge la durée de l'intervention et augmente le risque de traumatisme rétinien.

Il nous a donc paru utile d'utiliser une coloration pour permettre la visualisation de cette couche rétinienne et d'en faire l'ablation systématique lors du traitement chirurgical des MER.

## **CHAPITRE III**

### **NOTRE ETUDE**

L' utilisation de colorant vitaux, tels que le vert d'indocyanine, permettant de visualiser la MLI a été essentiellement décrite dans le traitement chirurgical des trous maculaires.

Notre étude rapporte l'intérêt de son utilisation per-opératoire dans la chirurgie des MER, analyse de façon rétrospective les rapports tissulaires entre les MER et la MLI sous-jacente prélevées lors de la chirurgie vitréo-rétinienne à l'aide de la coloration au vert d'indocyanine, décrit les différents aspects retrouvés en microscopie confocale à la recherche une corrélation anatomo-clinique .

## I. MATERIEL

Elle inclut 31 patients opérés de MEM par le même chirurgien entre novembre 2000 et septembre 2001, âgés en moyenne de 66,13 ans (extrêmes : 5 à 79 ans) comprenant 15 femmes et 16 hommes.

Les MEM se répartissaient selon une étiologie primitive dans 26 cas (83,8%) et secondaire dans 5 cas (16.1%) (2 DR, 1 OVCR, 1 angiome rétinien, 1 récurrence).

Parmi les 26 cas de MER idiopathiques, 2 cas de syndrome de traction vitréo-maculaire ont été inclus.

L'acuité visuelle préopératoire était en moyenne de 3/10<sup>e</sup> P6, les symptômes (BAV et/ou métamorphopsies) évoluant en moyenne depuis 13,6 mois (de 1 à 40 mois). 83,3% des patients étaient phaques, 16,1% pseudophaques, et 0,6% ont bénéficié d'une chirurgie combinée améliorant la visibilité du fond d'œil.

L'acuité visuelle post-opératoire n'a pas été retenue comme critère d'étude compte tenu de la répartition irrégulière des sujets phaques et pseudophaques dans les différents groupes et de l'absence de chirurgie des cataractes secondaires.

Lors des 31 interventions chirurgicales successives, le vert d'indocyanine a été utilisé avant le pelage de la MEM. Pour chaque patient des prélèvements ont été systématiquement réalisés en peropératoire et disposés entre lame et lamelle. Cependant la petitesse des fragments anatomiques ont rendu difficile leur exploitation en anatomopathologie.

Seuls 26 prélèvements histologiques prélevés chez 21 patients ont pu être analysés en microscopie confocale et pour 8 d'entre eux associés à un examen immunohistochimique en microscopie optique par les anticorps anti-GFAP(Glial Fibrillary Acid Protein), anti-vimentine, et anti-kératine.

Au troisième mois post-opératoire, chaque patient a bénéficié d'une angiographie en fluorescéine.

Chaque patient a été suivi en moyenne de 3,6 mois ( avec des extrêmes de 1 à 8 mois )

## **II. METHODE**

L'examen pré opératoire de chaque patient a compris la mesure de l'acuité visuelle, un examen biomicroscopique du fond d'œil et une angiographie en fluorescéine permettant de distinguer les MEM selon leur densité :

- aspect cellophane, fine et translucide au fond d'œil, à peine visible sur les clichés en lumière bleue (11 cas).
- aspect fibreux et épaissi, bien visible sur les clichés monochromatiques (20 cas).

Chaque intervention est filmée nous permettant une analyse rétrospective de la localisation et de la coloration des prélèvements recueillis.

L'intervention est réalisée classiquement sous anesthésie loco-régionale. Elle débute par une vitrectomie postérieure centrale grâce à trois voies d'abord à la pars plana permettant d'accéder pôle postérieur.

Le colorant est préparé selon la dilution suivante : 25 de mg de lyophilisât d'indocyanine (laboratoire CERB) est homogénéisé avec 5 cc de sérum glucosé à 5% puis dilué dans 5 cc de BSS. La préparation est réalisée par la pharmacie sous une hotte à flux laminaire et filtrée au travers d'un filtre de 5 µm.

Le vert d'indocyanine est ensuite injecté à l'aide d'une aiguille à bout mousse, après avoir stoppé l'infusion évitant ainsi les turbulences et la coloration des autres structures anatomiques. Le colorant doit recouvrir uniformément tout le pôle postérieur (0.2 à 0.4 ml). Il est laissé en place une à deux minutes puis aspiré passivement à l'aide d'une canule d'extrusion à bout de silicone souple (« back flush needle »).

On observe alors la répartition de la coloration restant au pôle postérieur. L'aspect le plus souvent retrouvé est celui d'une coloration annulaire laissant une plage centrale en carte de géographie non colorée, puis une coloration hétérogène en patch en périphérie de l'aire maculaire non colorée, et plus rarement une coloration verte homogène du pôle postérieur.

Dans les deux premiers cas, elle va faciliter le repérage du bord de la membrane qui est soulevée au crochet spatulé à la limite des zones colorées puis disséquée d'un seul tenant (dans la mesure du possible) grâce la pince d'Eckardt.

Lorsqu'un bord n'était pas retrouvé, on a utilisé une micro lance de 20 Gauges à l'extrémité légèrement recourbée pour inciser en zone colorée et permettre de continuer le pelage de proche en proche à la pince.

Dans tous les cas, une deuxième injection de vert d'indocyanine a été réalisée.

Cette seconde injection a permis de mieux visualiser les reliquats tissulaires dans les cas les plus difficiles, lorsque la MEM trop friable n'a pas été prélevée d'un seul tenant, de compléter la chirurgie lorsque persistait un reflet brillant,

un déplissement incomplet de la rétine superficielle, avec une ablation systématique des structures maculaires colorées.

L'intervention est terminée par une vérification soignée de la périphérie rétinienne à la recherche de déhiscences, en particuliers autour de l'orifice de sclerotomie ayant servi aux manœuvres itératives liées aux instillations du colorant et aux prélèvements.

La surveillance postopératoire a compris un examen biomicroscopique à J1, à 1 semaine, 1 mois et à 3 mois avec réalisation d'une angiographie fluorescéinique entre le 1er et le 3è mois postopératoire à la recherche d'effets secondaires infracliniques.

Les analyses histologiques des pièces opératoires en ont été réalisées sur un microscope confocal ( Nikon EZ 2000 fluorescence E 800) après un immunomarquage par les anticorps anti-GFAP, et marquage cellulaire par l'iodure de propidium.

Les huit membranes observées en microscopie optique ont été fixées dans une solution de formaldéhyde à 10%, incluses en paraffine, coupées à 5 µm d'épaisseur et colorées de façon standard par Periodic Acid-Schiff (PAS), Hématéïne Eosine Safran (HES) et trichrome de Masson. Elles ont ensuite été marquées par les trois anticorps précédemment cités de façon indépendante.

À titre de comparaison, nous a analysé en microscopie confocale et en microscopie optique la limitante interne teintée au vert d'indocyanine provenant de la chirurgie de cinq trous maculaires idiopathiques selon les mêmes techniques.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de tableaux de contingence de variables nominales grâce au test de Chi-2.



### III. RESULTATS

#### A. COLORATION PEROPERATOIRE

On répartit en 4 classes différentes la coloration du pôle postérieur obtenue chez les 31 patients opérés :

- absence de coloration (6 cas),
- coloration annulaire laissant une zone maculaire en carte de géographie non imprégnée (10 cas), (annexe 3 :figure 2)
- coloration hétérogène en plages, entourant l'aire maculaire non colorée (11 cas).
- plage de coloration centrale (4 cas).

L'absence de coloration est liée dans 5 cas à des erreurs de préparation ( 3 cas de dilution inefficace, 2 cas de préparation trop précoce) engendrant une précipitation du produit et un cas d'instillation sur MEM très étendue et épaisse ne laissant qu'une légère imprégnation trop périphérique pour aider à la dissection de cette MEM.

Dans tous les autres cas, l'ICG s'est montré d'une aide précieuse en révélant un bord de la MEM, en précisant son étendue, en évitant la perte du lambeau soulevé en cours d'ablation. La seconde injection permet d'évaluer son acte thérapeutique : soit la MLI a été ôtée en même temps que la MEM laissant une zone centrale non teintée, soit elle réalise une coloration secondaire homogène centrale qu'il devient plus aisé de peler puisqu'elle se détache en vert sur le fond rose des couches rétinienne sous-jacentes (annexe 3 : fig.3 et 4).

L'analyse des corrélations statistiques entre la densité clinique de la membrane et la coloration peropératoire retrouve une différence marquée : en carte de géographie pour les membranes épaisses, en plages hétérogènes autour de l'aire maculaire ou centrale et homogène pour les plus fines.  
(Chi-2 = 16.003, p = 0.0011) (Annexe 4 : fig.5 et 6)

## B. CORRELATIONS ANATOMO-CLINIQUES

Pour la suite des analyses statistiques, nous restreignons le groupe d'étude aux patients dont les prélèvements ont pu être analysés en microscopie, soit 26 fragments issus de 21 yeux.

### 1. Relation entre la densité de la MEM et ses constituants anatomiques.

Sur les 26 pièces étudiées en microscopie confocale, on compte 13 pièces issues de MEM épaisses et 13 pièces issues de MEM fines.

En microscopie confocale, on différencie 3 types de tissus. (Annexe 5)

- La MLI est reconnaissable sous la forme d'un voile plus ou moins épais, plicaturé, acellulaire. Sa fluorescence verte est un artefact et ne correspond pas à l'imprégnation du vert d'indocyanine qui est malheureusement lavé par les techniques de fixation (17 cas au total, soit 65,35% provenant dans 4 cas de MEM cliniquement épaisses, dans 13 cas de membranes fines).
- Les MEM correspondent à des structures multicellulaires dont les noyaux colorés en rouge par l'iodure de propidium se distinguent de la matrice extracellulaire verte (7 cas, soit 26,92 % provenant toutes de MEM denses)
- Enfin 2 pièces présentent l'association des 2 structures sur un même prélèvement (provenant du pelage de membranes épaisses).

Il existe une corrélation statistiquement significative entre le type de membrane et sa composition ( $\chi^2 = 13,765$  avec  $p = 0.01$ ) : en microscopie confocale, les prélèvements issus des MEM épaisses correspondent aux tissus multicellulaires, ceux issus des MEM fines sont acellulaires ou paucicellulaires ressemblant à de la MLI. (Annexe 4 : fig25 et 26)

## 2. Relation entre la coloration du prélèvement et son analyse en microscopie confocale.

L'origine peropératoire de ces mêmes 26 prélèvements se distribue en 17 pièces teintées par le vert d'indocyanine et 9 pièces non colorées. Elle a été rapportée à leur structure (17 pièces acellulaires ou paucicellulaires, 7 multicellulaires, 2 pièces mixtes )

On observe une relation significative entre la structure et la fixation de vert d'indocyanine ( $\chi^2 = 28,122$  avec  $p < 0.0001$ ) : les prélèvements multicellulaires et mixtes restent incolores, les autres fixent le colorant.

(Annexe 4 : fig. 7)

## 3. Comparaison aux MLI des Troues Maculaires Idiopathiques (TMI).

A titre de comparaison, 5 prélèvements réalisés au cours de la chirurgie de 5 yeux atteints d'un TMI stade IV ont été analysés en microscopie confocale.

Le pelage de la limitante interne a été là aussi effectuée à l'aide du vert d'indocyanine colorant uniformément le pôle postérieur.

L'aspect en microscopie confocale des MLI des TMI et des MEM est superposable

#### 4. Analyse des cas particuliers (Annexe 5 : fig.1 à 24)

Pour 2 cas de MEM très épaisses ayant fixé le vert d'indocyanine de façon annulaire (sa partie la plus dense cliniquement restant incolore), l'ablation n'a pas pu être réalisée en une seule fois. Nous avons donc obtenu plusieurs types de prélèvements.

Le premier provient de la zone centrale. Il est extrêmement riche en cellules marquées par le GFAP, désignant leur origine gliale.

Le second contient les deux types de tissus : une zone acellulaire (MLI) juxtaposée à une zone dense en cellules. L'ablation de la MEM a donc emportée avec elle un petit lambeau de MLI.

Enfin le troisième, provenant d'une zone colorée uniformément après une seconde injection de colorant ne contient plus qu'un tissu anhiste : la MLI.

Pour un cas de récurrence où la membrane n'était visible que par l'aspect cellophane de la rétine maculaire, le vert d'indocyanine s'est déposé uniformément au pôle postérieur. Le résultat de l'analyse microscopique attendu était l'aspect acellulaire d'une MLI alors que la microscopie confocale a retrouvé quelques cellules gliales à sa surface.

Pour ce même patient, l'examen en microscopie optique confirme la présence d'un large lambeau de MLI sous la forme d'un ruban plicaturé, bordé de quelques cellules de phénotype glial.

Dans un cas de fine membrane, la microscopie confocale a révélé une image très particulière de tissu acellulaire (ne contenant pas de noyau cellulaire marqué au propidium) contenant dans son épaisseur une mosaïque de rosettes régulièrement disposées, marquées par l'anti-GFAP. Nous pensons qu'il s'agit du cytosquelette microtubulaire contenu dans les expansions des cellules de Müller, dont les pieds adhérents à la MLI ont été emportés lors de son pelage.

L'examen en microscopie confocale d'autres prélèvements de MER fines retrouve des cellules complètes adhérentes à la MLI dont la morphologie et le marquage GFAP+ sont compatibles avec des cellules de Müller.

## IV. DISCUSSION

Le traitement chirurgical des membranes épimaculaires est devenu une des causes les plus fréquentes de chirurgie vitréo-rétinienne. L'amélioration des techniques de microchirurgie permet l'ablation de membranes extrêmement fines de la surface de la rétine. Cependant, une chirurgie complète reste difficile même pour un chirurgien expérimenté, parfois limitée par le manque de contraste entre les structures pathologiques et les couches internes de la rétine.

Nous discuterons de l'intérêt de ICG dans la technique chirurgicale, support des études histologiques permettant une approche de la physiopathologie des MEM. La microscopie confocale est une technique originale d'examen histologique qui a l'avantage de pouvoir analyser des pièces épaisses avec précision avec un nombre limité de manipulations. Cela évite la perte des échantillons.

### A. ICG ADJUVANT CHIRURGICAL

Les premières utilisations du vert d'indocyanine dans la chirurgie vitréo-rétinienne datent de 1999. BURK (9) et KADONOSONO (57) ont les premiers publiés leur mode d'utilisation du vert d'indocyanine appliqué à la chirurgie des trous maculaires. Par la suite plusieurs publications ont montré le bénéfice de cette coloration peropératoire en améliorant significativement la visualisation de la membrane limitante interne lors de son pelage (19,32,65).

Dans notre étude l'utilisation du vert d'indocyanine s'est montrée d'une aide considérable à la chirurgie des MEM en les rendant mieux visibles dans 80% des cas (25/31). L'inefficacité du vert d'indocyanine pour les premiers cas étudiés est en rapport avec des difficultés de préparation. En effet, nous avons suivi les protocoles de dilution des publications américaines utilisant de l'indocyanine iodée alors que le lyophilisat disponible en France est de l'infracyanine ne contenant pas d'iode. Ce substrat dilué avec du sérum salé précipite beaucoup plus ne permet pas l'imprégnation des tissus rétinien. Sa préparation doit être contemporaine de la vitrectomie pour éviter sa précipitation avant l'injection.

Après avoir adapté notre préparation, toutes les autres MEM ont pu être colorées. La chirurgie est alors grandement facilitée (excepté dans un cas de MEM très étendue où la coloration trop périphérique n'a pas contribué au premier temps opératoire). L'ICG permet le repérage d'un bord de la membrane épitréiniennne qui peut alors être directement enlevée à la pince. Elle permet de vérifier l'absence de reliquat et donc de faire une chirurgie plus complète. Pour certains cas, s'il existe un doute peropératoire, une seconde injection permet de vérifier qu'il ne reste plus de substrat pathologique ou de continuer la dissection.

**Le chirurgien a donc la satisfaction d'un traitement aussi complet que possible avec un risque de traumatisme mécanique moindre, un temps opératoire réduit et une phototoxicité plus limitée.**

## B. INNOFENSIF OU TOXIQUE ?

Le vert d'indocyanine est un colorant fluorescent utilisé dès 1957 pour les explorations fonctionnelles cardiaques ou hépatiques (74). Son application à l'ophtalmologie depuis près de trente ans a permis la réalisation d'imagerie rétinienne et choroïdienne (20). Sa tolérance intraveineuse et son innocuité ont été démontrées dans ces indications (52,68).

Sa toxicité cellulaire au cours de la chirurgie intraoculaire fait l'objet de plusieurs publications mais n'a pas été démontrée : Mc ENERNEY rapporte son utilisation pour apprécier la qualité des cellules endothéliales de greffons cornéens (74), HORIGUCHI l'utilise pour améliorer la visibilité de la capsule antérieure du cristallin au cours de la chirurgie des cataractes blanches (53). Ils concluent à l'absence de souffrance des cellules endothéliales.

Son utilisation en chirurgie endo-vitréenne est plus récente et concerne principalement les trous maculaires.

La toxicité directe de l'ICG est évoquée par deux auteurs sur les constatations suivantes :

- GANDORFER est surpris par la présence d'organelles et de fragments de cellule de Müller à la face externe de la MLI réséquée grâce au vert d'indocyanine. Il évoque une action biochimique néfaste du colorant modifiant les plans de clivage. Mais il n'a pas de groupe témoin de comparaison (31). Nous pensons qu'il est naturel aux vues des descriptions anatomiques de FOOS qu'il reste des parcelles de membrane cytoplasmique des cellules de Müller (cf rappels anatomiques). Ces structures sont d'ailleurs visibles sur les clichés en microscopie électronique de YOON n'utilisant pas d'ICG (112), et décrite par SEBAG (91).

**Nous avons aussi retrouvé des débris de cellules gliales sur l'une des faces de limitante interne en microscopie confocale, voire des cellules entières.**



- ENGELBRECHT et son équipe pense que l'ICG aurait une toxicité directe sur les cellules de l'EP. Dans 50% des cas opérés avec coloration, il retrouve des altérations de l'épithélium pigmentaire visibles en angiographie fluorescéinique (24). Ses études in vitro comparent l'action de l'ICG associée à une source lumineuse à celle de l'exposition lumineuse seule sur deux populations cellulaires d'EP cultivées in vitro. Il ne retrouve pas de différence histologique ou ultrastructurale mais une réduction de leur activité enzymatique mitochondriale (94). D'autre part, BANKER avait déjà observé des altérations marquées de l'épithélium pigmentaire post-opératoires dans 33% de cas de chirurgie de trous maculaires stade IV sans adjonction d'ICG (3).

La persistance de colorant infraclinique, révélée par un cliché en autofluorescence ICG six semaines après son utilisation, n'est pas forcément néfaste (107). Elle suggère néanmoins une demi-vie intravitréenne importante.

**Bien qu'elles aient été précocement réalisées, les angiographies en fluorescence n'ont pas révélé de toxicité rétinienne liée à son utilisation .**

Lors de la chirurgie des MEM, l'ICG reste à distance des couches rétinienne les plus profondes et la toxicité directe potentielle serait moindre.

**Cependant il convient de rester prudent devant cette diminution d'activité enzymatique des cellules épithéliales et la persistance prolongée du colorant au contact des structures intraoculaires.**

### C. QUE COLORE L'ICG ?

C'est une molécule de haut poids moléculaire (775 daltons). Sa structure lui confère des propriétés amphiphiles (à la fois hydrophile et hydrophobe) et explique sa forte affinité pour les protéines plasmatiques en particulier envers les lipoprotéines mais aussi pour les protéines membranaires (20). Il semblerait que cette molécule ait une affinité particulière pour les constituants des matrices extracellulaires tels que la laminine et le collagène(99 ). Cependant, elle ne se fixe pas aux membranes cellulaires intactes des cellules vivantes (73). On comprend donc que l'ICG colore préférentiellement les tissus paucicellulaires comme la limitante interne mais aussi d'autres membranes basales (comme celle de la capsule du cristallin).

Cela nous a tout d'abord paru contradictoire avec nos observations peropératoires puisque plusieurs MEM fines paraissaient fixer l'ICG ; mais l'analyse de ces membranes en microscopie confocale a retrouvé un tissu quasi acellulaire pouvant se confondre avec une MLI et expliquer la corrélation statistique que nous avons retrouvé entre la prise de contraste et la structure de membrane.

Ces constatations rejoignent donc les résultats de GANDORFER et de KUSAKA (32,64). Seule une publication de KUSAKA (64) décrit l'utilisation de cet adjuvant chirurgical pour le traitement d'une membrane épimaculaire secondaire à un décollement de rétine. La coloration du fond d'œil obtenue dans cette publication correspond à celle que nous avons obtenue lors des chirurgies des membranes épaisses.

Dans les cas de membranes cellophanes, le pelage ayant débuté en zone colorée a permis de soulever en un seul temps la MLI et la MEM. L'ablation de la MLI est confirmée par l'absence de coloration lors d'une nouvelle injection à la fin de l'intervention. Il n'existe donc pas de plan de clivage naturel entre ces deux structures ou bien un plan plus résistant que celui entre la MLI et la

couche des fibres optiques. Cette théorie a été supportée par FOOS qui décrit la présence d'hémidesmosomes entre les pieds des cellules de Müller et les cellules formant les MEM (29) et plus récemment par TRESE (101) qui retrouve ces « plaques d'attachement » plus denses et plus nombreuses dans les membranes paucicellulaires. **Nos observations en microscopie confocale ont aussi retrouvé des éléments de cytosquelette d'origine gliale sur l'une des faces de la MLI, à chaque fois sur des MER fines.**

L'étude des membranes plus épaisses montrent qu'elles sont en effet constituées de plusieurs couches cellulaires, ce qui empêche la fixation de l'ICG sur ses parties les plus charnues. Cette fois l'ablation se fait en plusieurs temps. Lorsqu'elle débute dans son épaisseur le geste est incomplet, ne retirant que très partiellement la MLI sous-jacente. Pour TRESE ceci est dû à la présence de desmosomes et de « gap-junction » intercellulaires rendant cette membrane plus cohésive alors que les « plaques d'attachement » la reliant à la MLI sont beaucoup moins nombreuses. Là encore, nous avons obtenus des résultats semblables : seuls deux prélèvements de membrane épaisse sont mixtes.

La similitude en microscopie confocale des MLI provenant de la chirurgie des trous maculaires idiopathiques et des membranes épimaculaires cellophanes pourrait amener à une approche commune de ces deux pathologies où la MLI pathologique serait le point de départ. DUCOURNAU a déjà émis l'hypothèse qu'une gliose de la MLI en serait le substrat commun, que seul le retrait de cette MLI pathologique permettrait ensuite la régénération d'une nouvelle MLI. Pour lui, il existe un plan de clivage net entre la MLI et les cellules de Müller sous-jacentes des membranes primitives (21). **Nos observations sont en désaccord puisqu'on retrouve des cellules gliales sur plusieurs échantillons en contact étroit avec la MLI. Elles jouent donc un rôle majeur dans le développement des MEM, leur adhérence pathologique corroborant les hypothèses de gliose ou fibrose de la MLI.**

## D. CONCLUSION

Grâce à son affinité pour les tissus acellulaires ou paucicellulaires, le vert d'indocyanine colore de façon assez sélective la membrane limitante interne. La membrane épimaculaire se détachant alors en négatif. Il améliore considérablement les conditions opératoires, réduit la durée de l'intervention, le risque traumatique et la phototoxicité. Nous n'avons pas mis en évidence de toxicité directe du colorant. Les coupes de prélèvements analysées en microscopie confocale retrouvent un contingent glial adhérent à la membrane limitante interne en faveur d'un processus de gliose pathologique que seule son ablation éliminerait. Reste à comprendre quel est le stimulus initial de cette gliose ?

L'ICG en permettant d'uniformiser la technique chirurgicale de l'ablation des MEM sera d'un apport fondamental aux études sur la physiopathologie des MEM, puisque les analyses ultrastructurales seront réalisées sur des échantillons homogènes répartis selon leur coloration quelque soit la présentation clinique et quelque soit le chirurgien diminuant ainsi les limites des études précédentes.

Tant que son innocuité à long terme n'est pas démontée, son utilisation doit rester dans ce cadre expérimental.

ANNEXE1

ANNEXE2

Annexe3 a remplacer par photo

Annexe 3 fig 2.3



## ANNEXE 4 : RESULTATS DES ANALYSES STATISTIQUES

**Figure 1 : Tableau “résumé” pour coloration, forme clinique**

Manquants	0
DDL	3
Chi 2	16,003
p (Chi 2)	,0011
G-carré	•
p (G-carré)	•
Coef. de contingence	,583
V de Cramer	,718

**Figure 2 : Fréquences observées pour forme clinique, coloration**

	annulaire	aucune	centrale	patch	Totaux
épaisse	7	4	0	0	11
fine	3	2	4	11	20
Totaux	10	6	4	11	31

**Figure 3 : Chi 2 des cellules pour forme clinique, coloration**

	annulaire	aucune	centrale	patch
épaisse	3,357	1,644	1,419	3,903
fine	1,847	,904	,781	2,147

**Figure 4 : Forme clinique et résultat histologique :répartition**

	mer	mli	mli-mer	Totaux
épaisse	53,846	30,769	15,385	100,000
fine	0,000	100,000	0,000	100,000
Totaux	26,923	65,385	7,692	100,000

**Figure 5 :****Tableau pour forme clinique, résultat histologique**

Manquants	0
DDL	2
Chi 2	13,765
p (Chi 2)	,0010
Coef. de contingence	0,588
V de Cramer	0,728

**Figure 6 :****Pourcentages pour coloration du prélèvement, résultats histologiques**

	mer	mli	mli-mer	Totaux
icg+	0,000	100,000	0,000	100,000
icg-	71,429	0,000	28,571	100,000
non coloré	100,000	0,000	0,000	100,000
Totaux	26,923	65,385	7,692	100,000

**Figure 7 :****Tableau résumé pour résultats histologiques, coloration du prélèvement**

DDL	4
Chi 2	28,122
p (Chi 2)	<u>&lt;0,0001</u>
Coef. de contingence	<u>0,721</u>
V de Cramer	<u>0,735</u>

**Figure 8:****Tableau résumé pour résultats histologiques, coloration du prélèvement**

Manquants	<u>0</u>
DDL	<u>4</u>
Chi 2	<u>28,122</u>
p (Chi 2)	<u>&lt;,0001</u>
Coef. de contingence	<u>0,72</u>
V de Cramer	<u>0,735</u>