

2020-2021

## THÈSE

pour le

### DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Qualification en OPHTALMOLOGIE

# A TEAR METABOLOMIC PROFILE SHOWING AN INVOLVEMENT OF SPERMINE IN THYROID- ASSOCIATED ORBITOPATHY.

Un profil métabolomique dans les larmes montrant  
l'implication de la spermine dans l'orbitopathie de  
Basedow.

**BILLIET Benjamin**

Né le 22 Avril 1993 à DJIBOUTI

Sous la direction du Professeur REYNIER Pascal  
Et du Docteur GOHIER Philippe

#### Membres du jury

Monsieur le Professeur RODIEN Patrice	Président
Monsieur le Professeur REYNIER Pascal	Directeur
Monsieur le Docteur GOHIER Philippe	Codirecteur
Monsieur le Docteur CHAO DE LA BARCA Juan Manuel	Membre
Madame le Docteur ASSAD-BORDURE Sophie	Membre

Soutenue publiquement le :  
08 Octobre 2021



**FACULTÉ  
DE SANTÉ**  
UNIVERSITÉ D'ANGERS



# ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné Benjamin BILLIET  
déclare être pleinement conscient que le plagiat de documents ou d'une  
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,  
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.  
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées  
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant le **13/09/2021**

# LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE SANTÉ D'ANGERS

---

**Doyen de la Faculté** : Pr Nicolas Lerolle

**Vice-Doyen de la Faculté et directeur du département de pharmacie** : Pr Frédéric Lagarce

**Directeur du département de médecine** : Pr Cédric Annweiler

## PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

ABRAHAM Pierre	Physiologie	Médecine
ANNWEILER Cédric	Gériatrie et biologie du vieillissement	Médecine
ASFAR Pierre	Réanimation	Médecine
AUBE Christophe	Radiologie et imagerie médicale	Médecine
AUGUSTO Jean-François	Néphrologie	Médecine
BAUFRETON Christophe	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire	Médecine
BELLANGER William	Médecine Générale	Médecine
BENOIT Jean-Pierre	Pharmacotechnie	Pharmacie
BIGOT Pierre	Urologie	Médecine
BONNEAU Dominique	Génétique	Médecine
BOUCHARA Jean-Philippe	Parasitologie et mycologie	Médecine
BOUET Pierre-Emmanuel	Gynécologie-obstétrique	Médecine
BOUVARD Béatrice	Rhumatologie	Médecine
BOURSIER Jérôme	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
BRIET Marie	Pharmacologie	Médecine
CALES Paul	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
CAMPONE Mario	Cancérologie ; radiothérapie	Médecine
CAROLI-BOSC François-Xavier	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
CONNAN Laurent	Médecine générale	Médecine
COPIN Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
COUTANT Régis	Pédiatrie	Médecine
CUSTAUD Marc-Antoine	Physiologie	Médecine
DE CASABIANCA Catherine	Médecine Générale	Médecine
DESCAMPS Philippe	Gynécologie-obstétrique	Médecine
D'ESCATHA Alexis	Médecine et santé au travail	Médecine
DINOMAS Mickaël	Médecine physique et de réadaptation	Médecine
DIQUET Bertrand	Pharmacologie	Médecine
DUBEE Vincent	Maladies Infectieuses et Tropicales	Médecine
DUCANCELLE Alexandra	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
DUVAL Olivier	Chimie thérapeutique	Pharmacie
DUVERGER Philippe	Pédopsychiatrie	Médecine
EVEILLARD Mathieu	Bactériologie-virologie	Pharmacie
FAURE Sébastien	Pharmacologie physiologie	Pharmacie
FOURNIER Henri-Dominique	Anatomie	Médecine

FURBER Alain	Cardiologie	Médecine
GAGNADOUX Frédéric	Pneumologie	Médecine
GOHIER Bénédicte	Psychiatrie d'adultes	Médecine
GUARDIOLA Philippe	Hématologie ; transfusion	Médecine
GUILET David	Chimie analytique	Pharmacie
GUITTON Christophe	Médecine intensive-réanimation	Médecine
HAMY Antoine	Chirurgie générale	Médecine
HENNI Samir	Médecine Vasculaire	Médecine
HUNAUULT-BERGER Mathilde	Hématologie ; transfusion	Médecine
IFRAH Norbert	Hématologie ; transfusion	Médecine
JEANNIN Pascale	Immunologie	Médecine
KEMPF Marie	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
LACCOURREYE Laurent	Oto-rhino-laryngologie	Médecine
LAGARCE Frédéric	Biopharmacie	Pharmacie
LARCHER Gérald	Biochimie et biologie moléculaires	Pharmacie
LASOCKI Sigismond	Anesthésiologie-réanimation	Médecine
LEGENDRE Guillaume	Gynécologie-obstétrique	Médecine
LEGRAND Erick	Rhumatologie	Médecine
LERMITE Emilie	Chirurgie générale	Médecine
LEROLLE Nicolas	Réanimation	Médecine
LUNEL-FABIANI Françoise	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
MARCHAIS Véronique	Bactériologie-virologie	Pharmacie
MARTIN Ludovic	Dermato-vénéréologie	Médecine
MAY-PANLOUP Pascale	Biologie et médecine du développement et de la reproduction	Médecine
MENEI Philippe	Neurochirurgie	Médecine
MERCAT Alain	Réanimation	Médecine
PAPON Nicolas	Parasitologie et mycologie médicale	Pharmacie
PASSIRANI Catherine	Chimie générale	Pharmacie
PELLIER Isabelle	Pédiatrie	Médecine
PETIT Audrey	Médecine et Santé au Travail	Médecine
PICQUET Jean	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire	Médecine
PODEVIN Guillaume	Chirurgie infantile	Médecine
PROCACCIO Vincent	Génétique	Médecine
PRUNIER Delphine	Biochimie et Biologie Moléculaire	Médecine
PRUNIER Fabrice	Cardiologie	Médecine
REYNIER Pascal	Biochimie et biologie moléculaire	Médecine
RICHARD Isabelle	Médecine physique et de réadaptation	Médecine
RICHOMME Pascal	Pharmacognosie	Pharmacie
RODIEN Patrice	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques	Médecine
ROQUELAURE Yves	Médecine et santé au travail	Médecine
ROUGE-MAILLART Clotilde	Médecine légale et droit de la santé	Médecine
ROUSSEAU Audrey	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine

ROUSSEAU Pascal	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique	Médecine
ROUSSELET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
ROY Pierre-Marie	Thérapeutique	Médecine
SAULNIER Patrick	Biophysique et Biostatistiques	Pharmacie
SERAPHIN Denis	Chimie organique	Pharmacie
SCHMIDT Aline	Hématologie ; transfusion	Médecine
TRZEPIZUR Wojciech	Pneumologie	Médecine
UGO Valérie	Hématologie ; transfusion	Médecine
URBAN Thierry	Pneumologie	Médecine
VAN BOGAERT Patrick	Pédiatrie	Médecine
VENARA Aurélien	Chirurgie viscérale et digestive	Médecine
VENIER-JULIENNE Marie-Claire	Pharmacotechnie	Pharmacie
VERNY Christophe	Neurologie	Médecine
WILLOTEAUX Serge	Radiologie et imagerie médicale	Médecine

#### MAÎTRES DE CONFÉRENCES

ANGOULVANT Cécile	Médecine Générale	Médecine
BAGLIN Isabelle	Chimie thérapeutique	Pharmacie
BASTIAT Guillaume	Biophysique et Biostatistiques	Pharmacie
BEAUVILLAIN Céline	Immunologie	Médecine
BEGUE Cyril	Médecine générale	Médecine
BELIZNA Cristina	Médecine interne	Médecine
BELONCLE François	Réanimation	Médecine
BENOIT Jacqueline	Pharmacologie	Pharmacie
BESSAGUET Flavien	Physiologie Pharmacologie	Pharmacie
BIERE Loïc	Cardiologie	Médecine
BLANCHET Odile	Hématologie ; transfusion	Médecine
BOISARD Séverine	Chimie analytique	Pharmacie
BRIET Claire	Endocrinologie, Diabète et maladies métaboliques	Médecine
BRIS Céline	Biochimie et biologie moléculaire	Pharmacie
CAPITAIN Olivier	Cancérologie ; radiothérapie	Médecine
CASSEREAU Julien	Neurologie	Médecine
CHEVALIER Sylvie	Biologie cellulaire	Médecine
CLERE Nicolas	Pharmacologie / physiologie	Pharmacie
COLIN Estelle	Génétique	Médecine
DERBRE Séverine	Pharmacognosie	Pharmacie
DESHAYES Caroline	Bactériologie virologie	Pharmacie
FERRE Marc	Biologie moléculaire	Médecine
FORTRAT Jacques-Olivier	Physiologie	Médecine
GUELFF Jessica	Médecine Générale	Médecine
HAMEL Jean-François	Biostatistiques, informatique médicale	Médicale

HELESBEUX Jean-Jacques	Chimie organique	Pharmacie
HERIVAUX Anaïs	Biotechnologie	Pharmacie
HINDRE François	Biophysique	Médecine
JOUSSET-THULLIER Nathalie	Médecine légale et droit de la santé	Médecine
JUDALET-ILLAND Ghislaine	Médecine générale	Médecine
KHIATI Salim	Biochimie et biologie moléculaire	Médecine
KUN-DARBOIS Daniel	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie	Médecine
LACOEUILLE Franck	Radiopharmacie	Pharmacie
LANDREAU Anne	Botanique/ Mycologie	Pharmacie
LEBDAL Souhil	Urologie	Médecine
LEGEAY Samuel	Pharmacocinétique	Pharmacie
LEMEE Jean-Michel	Neurochirurgie	Médecine
LE RAY-RICHOMME Anne-Marie	Pharmacognosie	Pharmacie
LEPELTIER Elise	Chimie générale	Pharmacie
LETOURNEL Franck	Biologie cellulaire	Médecine
LIBOUBAN Hélène	Histologie	Médecine
LUQUE PAZ Damien	Hématologie biologique	Médecine
MABILLEAU Guillaume	Histologie, embryologie et cytogénétique	Médecine
MALLET Sabine	Chimie Analytique	Pharmacie
MAROT Agnès	Parasitologie et mycologie médicale	Pharmacie
MESLIER Nicole	Physiologie	Médecine
MIOT Charline	Immunologie	Médecine
MOUILLIE Jean-Marc	Philosophie	Médecine
NAIL BILLAUD Sandrine	Immunologie	Pharmacie
PAILHORIE Hélène	Bactériologie-virologie	Médecine
PAPON Xavier	Anatomie	Médecine
PASCO-PAPON Anne	Radiologie et imagerie médicale	Médecine
PECH Brigitte	Pharmacotechnie	Pharmacie
PENCHAUD Anne-Laurence	Sociologie	Médecine
PIHET Marc	Parasitologie et mycologie	Médecine
POIROUX Laurent	Sciences infirmières	Médecine
PY Thibaut	Médecine Générale	Médecine
RAMOND-ROQUIN Aline	Médecine Générale	Médecine
RINEAU Emmanuel	Anesthésiologie réanimation	Médecine
RIOU Jérémie	Biostatistiques	Pharmacie
RIQUIN Elise	Pédopsychiatrie ; addictologie	Médecine
ROGER Emilie	Pharmacotechnie	Pharmacie
SAVARY Camille	Pharmacologie-Toxicologie	Pharmacie
SCHMITT Françoise	Chirurgie infantile	Médecine
SCHINKOWITZ Andréas	Pharmacognosie	Pharmacie
SPIESSER-ROBELET Laurence	Pharmacie Clinique et Education Thérapeutique	Pharmacie
TESSIER-CAZENEUVE Christine	Médecine Générale	Médecine
TEXIER-LEGENDRE Gaëlle	Médecine Générale	Médecine

VIAULT Guillaume

Chimie organique

Pharmacie

AUTRES ENSEIGNANTS

PRCE

AUTRET Erwan

Anglais

Médecine

BARBEROUSSE Michel

Informatique

Médecine

BRUNOIS-DEBU Isabelle

Anglais

Pharmacie

FISBACH Martine

Anglais

Médecine

O'SULLIVAN Kayleigh

Anglais

Médecine

PAST

CAVAILLON Pascal

Pharmacie Industrielle

Pharmacie

DILÉ Nathalie

Officine

Pharmacie

MOAL Frédéric

Pharmacie clinique

Pharmacie

PAPIN-PUREN Claire

Officine

Pharmacie

SAVARY Dominique

Médecine d'urgence

Médecine

ATER

Arrivée prévue nov 2021

Immunologie

Pharmacie

PLP

CHIKH Yamina

Economie-gestion

Médecine

AHU

CORVAISIER Mathieu

Pharmacie Clinique

Pharmacie

IFRAH Amélie

Droit de la Santé

Pharmacie

LEBRETON Vincent

Pharmacotechnie

Pharmacie



**A Monsieur le Professeur Patrice RODIEN,**

Vous nous faites l'honneur de présider cette thèse. Soyez assuré de ma grande considération.

**A Monsieur le Professeur Pascal REYNIER,**

Je vous remercie de m'avoir guidé tout au long de ce travail et d'avoir toujours été disponible pour répondre à mes questions. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

**A Monsieur le Docteur Philippe GOHIER,**

Je vous remercie de m'avoir proposé ce sujet de thèse et de votre enseignement en ophtalmologie aux cours des semestres. Soyez assuré de mon respect et de ma gratitude.

**A Monsieur le Docteur Juan Manuel CHAO DE LA BARCA,**

Je vous remercie de l'aide logistique et statistique apportée à ce sujet et de me faire l'honneur de juger cette thèse.

**A Madame le Docteur Sophie ASSAD-BORDURE,**

Je te remercie tout autant pour m'avoir guidé lors de mon arrivée au CHU, que pour avoir été une chef et une amie formidable avec qui travailler était tellement agréable. Te compter parmi les membres de ce jury est un honneur.

A l'équipe d'ophtalmologie du CHU d'Angers :

Au **Docteur Jean Marc EBRAN, Angélique CAIGNARD, Adib HEMADE, Marta DORVAULT, Fabien CROISE, Victor BIELEFELD, Thomas BRESSON, Bastien LEROUX** merci pour vos enseignements dans vos spécialités respectives, toujours dans une ambiance détendue et dans le plaisir du partage.

Au **Docteur Damien HAUTION** pour l'apprentissage chirurgical palpébral, de m'avoir guidé sur mes derniers semestres et aussi pour mes innombrables questions auxquelles tu as toujours réponse.

A **Jeanne MULLER** pour ton aide dans l'organisation et la gestion de ce travail.

Merci aussi à toute l'équipe paramédicale pour le support, la compréhension et l'aide tout au long de cet internat.

A l'équipe d'ophtalmologie de Laval :

Au **Docteur Lionel BIHL, Claire HERPE, Sonia BENSABER, Olfa KHARRAT,** merci de vos multiples accueils qui m'ont fait découvrir l'ophtalmologie et ensuite me perfectionner. Merci aussi à toute l'équipe paramédicale pour cette ambiance exceptionnelle.

A l'équipe de Biochimie du CHU et d'ORL du Mans pour m'avoir accueilli lors de mes semestres hors filière.

# REMERCIEMENTS

A l'équipe d'ophtalmologie du Mans :

Au **Docteur Renaud LABALLE, Mehdi CHERIF, Ramzi AIDAOUI**. Merci aussi à toute l'équipe paramédicale pour nous avoir toujours encouragé et soutenu.

~~~~~

A ma famille :

A **mes parents**, sans qui je ne serai jamais arrivé jusque-là, qui ont toujours été disponibles à m'encourager, me conseiller, me rassurer tout au long de ma vie et de mes études. Vous représentez énormément pour moi et je ne vous remercierai jamais assez de tout ce que vous faites.

A **ma grand-mère** qui a toujours attendu de pouvoir assister à ma thèse et à **mon grand-père** parti trop vite que j'aurais aimé être là. Merci pour tous ces fabuleux souvenirs d'enfance et de vacances passées ensemble un peu partout en France.

A la mémoire de mes **grands-parents maternels** que j'ai trop peu connu mais qui j'espère seraient fiers.

A ma **grande tante Monique** qui a sûrement dû me transmettre son goût du voyage.

A ma **marraine Delphine** et mon **parrain Jean** qui m'ont accompagné depuis tout petit.

Au Club Viet, vous avoir rencontré en voyage aura littéralement changé ma trajectoire :

A **Juliette**, pour cette rencontre austère qui s'est très vite transformée en une amitié inconditionnelle suite à un soudain craquement. Merci d'avoir éclairé mon choix d'internat au sens propre comme figuré et d'avoir été à l'écoute tout au long du parcours. Merci aussi d'être toujours à l'arrière du groupe avec moi pour mitrailler tous les cailloux et animaux de photos lors de nos nombreux voyages. Je serai toujours prêt à partager une pastèque avec toi.

A **Margaux**, parce qu'on est unis à vie par le gyros et la famille de l'Ouest. Merci de ne pas te décourager de nous rendre visite malgré tes nombreuses allergies.

A **Stéphanie**, pour ces moments de fou rire lors de cette panne au Vietnam à acheter un kilo de biscuit, pour être notre répondeur téléphonique préféré et pour ces épisodes de franchatittude involontaires.

A **Julie**, ma plantopathe préférée pour tes conseils parfois douteux et à **Christian**, le roi de l'ambiance allemande. Merci de nous héberger à chaque visite dans votre grand Est même celles les plus inattendues.

# REMERCIEMENTS

A **Louis**, notre guide de cordée difficile, je ne te remercie pas pour ces réveils au clairon mais plus pour le partage de ta passion de la climatisation et d'être toujours prêt à réaliser une fourberie avec moi & à **Pauline**, notre top chef du ski.

A **Yannis**, l'history sensei, pour ton humour décalé & à **Margot**, pour ton calme et ta patience à toute épreuve.

A **Anne-Justine**, pour ce voyage en Grèce dans le pays de tes ancêtres et pour ces descentes de ski au vin chaud.

A **Sophie**, pour nous avoir fait découvrir la Réunion pleine de péripéties et pour être mon amie aux 30 millions d'amis.

## Aux amis d'études :

A **Linda**, de nos soirées festives ou de conférences pendant l'externat à nos réunions du Grand Ouest pendant l'internat, je sais que je pourrais toujours compter sur toi (hormis pour l'entretien des plantes).

A **Emmanuelle**, pour le support sans faille en D4, pour mon fou rire le plus mémorable de BU et pour toutes ces soirées et voyages partagés au cours de l'externat. Malgré que l'on ne se soit pas suivi aux Antilles, merci de me les avoir fait découvrir au cours de l'internat.

A **Mathilde**, pour ces innombrables jeux de société mais aussi pour ces heures de soutien à travailler ensemble.

A **Bastien, Camille, Marie-Charlotte, Sandrine, Geoffrey, Lucie et à tous les Pilotes & Mousquetaires** pour ces souvenirs inoubliables.

## Aux rencontres lavalloises sans qui je n'aurais pu rêver d'un meilleur début d'internat :

A **Catherine**, ma première rencontre, ma chère voisine qui ne me laissait aucune chance de victoire à Smash Bros, et qui m'a entendu tousser pendant 6 mois à cause de ses virus pédiatriques & à **Pierre-Emmanuel** pour être aussi fou qu'elle.

A **Bastien**, qui m'a rappelé mes racines du Nord et qui m'a fait découvrir les pâtes aux sucres & à **Camille**, qui doit être en hyperglycémie à cause des pâtes pour expliquer une telle énergie constante.

A **Felix**, qui s'y connaît des fois autant que moi en ophtalmologie, mais bien plus en protection solaire.

A **Charlotte**, pour ces soirées de colocation passées à raconter nos vies, nos ambitions, nos craintes.

A **Pauline & François** pour ces retrouvailles inattendues lors des vacances.

# REMERCIEMENTS

A **Nicolas**, pour ton swing qui a pimenté nos soirées lavalloises & à **Hana** pour nous avoir fait partager votre magnifique mariage à Prague.

A **Léo**, notre mascotte mayennaise, je ne me remettrai jamais d'être monté dans ta voiture à autoradio tunée & à **Jessica** dont je suis sûr qu'on entendra le rire communicatif en lisant tout cela.

A **Fish**, pour ta bonne humeur légendaire qui n'est que façade.

A **Laurane**, pour ton sourire permanent & à **Thomas**.

A **Julien & Griselda**.

A mes actuels et anciens cointernes :

A **Anaïs**, pour nos nombreux semestres partagés ensemble, pour ta bonne humeur à toute épreuve qui nous aura souvent remonté le moral et pour ton aide immense dans ce travail, merci pour tout.

Aux cointernes angevins avec qui j'ai partagé des semestres : **Adrien, Barnabé, Grégoire, Maxime, Laurie, Thibault, Anne-Laure, Marin, Tristan, Alix, Aude, Mathieu, Anthony, Majid, Mohamed, Arthur**.

A **Camille, Guillaume, Valentin** bien que nous n'ayons jamais fait de semestre ensemble vous croiser était toujours un plaisir.

Aux cointernes nantais rencontrés au Mans : **Marie, Quentin, Florian, Audrey**.

~~~~~

Et à **Fabien**, pour être à la fois ma famille, mon ami et mon amour. Et aussi parfois mon collègue à force de m'écouter. Merci de m'avoir soutenu durant tout l'internat et dans mes moments de doute de faire ressortir le meilleur de moi-même. Peu importe la situation, tu arriveras toujours à me donner le sourire. J'ai hâte de continuer la grande aventure de la vie avec toi.

## Liste des abréviations

[illegible]

# Plan

<b>RESUME.....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>3</b>
<b>ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES .....</b>	<b>5</b>
A.    ÉPIDEMIOLOGIE .....	5
B.    PHYSIOPATHOLOGIE .....	5
C.    CLINIQUE .....	6
D.    TRAITEMENTS .....	9
E.    LE METABOLOME .....	13
F.    LE FILM LACRYMAL .....	13
G.    LIEN ENTRE METABOLOME ET LARMES. ....	14
<b>ARTICLE.....</b>	<b>16</b>
<b>DISCUSSION ET CONCLUSION .....</b>	<b>30</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>33</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>36</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>37</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>38</b>

# **A TEAR METABOLOMIC PROFILE SHOWING THE INVOLVEMENT OF SPERMINE IN THYROID-ASSOCIATED ORBITOPATHY.**

**Benjamin BILLIET<sup>1</sup>, Juan Manuel CHAO DE LA BARCA<sup>2,3</sup>, Marc FERRE<sup>3</sup>, Jeanne MULLER<sup>1</sup>, Anaïs VAUTIER<sup>1</sup>, Sophie ASSAD<sup>1</sup>, Odile BLANCHET<sup>4</sup>, Lydie TESSIER<sup>2</sup>, Céline WETTERWALD<sup>2</sup>, Justine FAURE<sup>2</sup>, Geoffrey URBANSKY<sup>3,5</sup>, Gilles SIMARD<sup>2</sup>, Delphine MIREBEAU-PRUNIER<sup>2,3</sup>, Patrice RODIEN<sup>3,6</sup>, Philippe GOHIER<sup>1</sup>, Pascal REYNIER<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup>Département d'Ophtalmologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU), F-49000 Angers, France

<sup>2</sup>Service de Biochimie et biologie moléculaire, Centre Hospitalier Universitaire, F-49000 Angers, France

<sup>3</sup>Université d'Angers, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche (UMR) MITOVASC, Structure Fédérative de Recherche (SFR) ICAT, F-49000 Angers, France

<sup>4</sup>Centre de Ressources Biologiques, Centre Hospitalier Universitaire, F-49000 Angers, France

<sup>5</sup>Service de Médecine Interne et d'Immunologie Clinique, Centre Hospitalier Universitaire, F-49000 Angers, France

<sup>6</sup>Service d'Endocrinologie, Centre Hospitalier Universitaire, F-49000 Angers, France

# RESUME

Objectif : Déterminer une signature métabolomique dans les larmes des patients atteints d'orbitopathie active de Basedow.

Méthodes : Comparaison de la composition métabolomique des larmes de patients présentant une orbitopathie active de Basedow (n=21) par rapport à ceux présentant une orbitopathie inactive de Basedow (n=24). Analyse par spectrométrie de masse avec le kit Biocrates Absolute IDQ p180 mesurant 188 métabolites.

Résultats : Parmi les 44 métabolites mesurés, huit présentaient des concentrations significativement modifiées entre les deux groupes comparés. Deux acylcarnitines à chaîne courte (propionylcarnitine, butyrylcarnitine) et la spermine ont montré des concentrations accrues dans le groupe des orbitopathies actives de Basedow, tandis que l'ornithine, la glycine, la sérine, la citrulline et l'histidine étaient diminuées dans ce groupe. Le rapport putrescine/ornithine représentant de l'activité de l'ornithine décarboxylase était significativement augmenté dans le groupe des orbitopathies actives de Basedow en comparaison avec le groupe des orbitopathies inactives de Basedow ( $p=0,0011$ , augmentation d'activité de 3,75 fois), la spécificité de ce biomarqueur étant maintenue par rapport à un groupe témoin indépendant présentant une sécheresse oculaire non classifiée.

Conclusion : Cette signature métabolique suggère fortement un mécanisme physiopathologique impliquant la stimulation de l'ornithine décarboxylase par les auto-anticorps du récepteur de la TSH dans les fibroblastes orbitaires, conduisant à une augmentation de la synthèse de spermine. Les propriétés prolifératives de la spermine pourraient contribuer à l'augmentation de la myogenèse et de l'adipogenèse périorbitaire. Nos résultats suggèrent un circuit métabolique qui pourrait à la fois fournir une nouvelle cible thérapeutique et un biomarqueur pour l'orbitopathie de Basedow active.

Mots-clés : Orbitopathie de Basedow ; Métabolomique ; Ornithine décarboxylase ; Spermine ; Orbitopathie dysthyroïdienne.



# INTRODUCTION

La maladie de Basedow est une pathologie inflammatoire et auto-immune qui implique dans de nombreux cas l'ophtalmologue, puisque l'atteinte oculaire est fréquente dans cette pathologie.

Dans la maladie de Basedow, l'inflammation oculaire trouverait son origine par l'activation des fibroblastes au niveau de la graisse périorbitaire et des muscles orbitaires. Il s'en suit une cascade immunologique via l'activation des lymphocytes orbitaires.

Des études ont trouvé un panel de métabolites dans le sérum pouvant être des biomarqueurs de la maladie de Basedow (1). D'autres études ont retrouvé des spécificités protéiques de la maladie de Basedow au niveau sérique (2), lacrymal (3) et des spécificités lipidiques au niveau plasmatique et urinaire (4). Quelques biomarqueurs sont potentiellement discriminant entre les formes de maladie de Basedow avec ou sans orbitopathie (5).

Jusqu'à ce jour aucune signature métabolomique n'a été établie dans les larmes des patients atteints d'orbitopathie de Basedow, malgré leur accessibilité et leur informativité potentielle. L'approche métabolomique d'analyse des larmes paraît donc légitime et pourrait permettre d'établir une signature biologique spécifique de l'orbitopathie de Basedow. L'analyse métabolomique des larmes a par ailleurs été déjà discriminante dans d'autres maladies ophtalmologiques impliquant une sécheresse oculaire, tel que la maladie de Gougerot-Sjögren (6).

La découverte d'un profil métabolomique spécifique au niveau des larmes des patients atteints d'orbitopathie de Basedow pourrait ainsi permettre de mieux comprendre la physiopathologie de cette atteinte. Dans un second temps ce profil pourrait permettre d'identifier des cas douteux grâce à un prélèvement simple en consultation

d'ophtalmologie, voire de suivre l'évolution de l'activité inflammatoire de la maladie ou de prévoir une rechute (7).

Nous proposons ainsi d'étudier le profil métabolomique des larmes des patients avec une orbitopathie de Basedow active, en comparaison avec le profil des orbitopathies de Basedow inactives et des patients avec sécheresse oculaire considérés comme témoins.

# ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

## A. Épidémiologie

La maladie de Basedow a une prévalence de 1 à 2% (8) et l'orbitopathie de Basedow a une prévalence estimée en Europe de 1/1000 personnes (9). Même si l'orbitopathie de Basedow est de nos jours en diminution grâce à une meilleure prise en charge des facteurs de risque tel que le tabagisme, la maladie de Basedow reste la dysthyroïdie causant le plus d'orbitopathie. Cette atteinte oculaire est plus fréquente entre 40 et 50 ans mais peut se produire à n'importe quel moment d'évolution de la maladie de Basedow. L'orbitopathie de Basedow présente une prépondérance féminine (5 femmes pour un homme), s'expliquant par l'épidémiologie même de la maladie de Basedow essentiellement féminine.

## B. Physiopathologie

La maladie de Basedow est une atteinte auto-immune ayant comme point de départ la stimulation du récepteur de la TSH au niveau de la thyroïde par les auto-anticorps anti-récepteurs de la TSH (TRAK). Cette stimulation entraîne à son tour une surexpression d'hormones thyroïdiennes par les thyrocytes réalisant un tableau clinique d'hyperthyroïdie.

L'orbitopathie de Basedow a pour point de départ elle aussi ces auto-anticorps TRAK agissant au niveau des fibroblastes orbitaires qui présentent un récepteur de la TSH. Ces fibroblastes sont la principale cible de la réaction immunitaire. Une fois activés, les fibroblastes se différencient ensuite selon l'expression de Thy-1 en myofibroblastes (Thy-1 positif) et en adipocytes (Thy-1 négatif) (10).

Les myofibroblastes sécrètent des glycosaminoglycanes au niveau musculaire, entraînant une augmentation du volume des muscles oculomoteurs. Les adipocytes quant à eux entraînent une expansion du volume graisseux de l'orbite.

Les fibroblastes recrutent aussi, via la sécrétion d'IL16 au niveau orbitaire, des lymphocytes T. Ces lymphocytes T activés vont sécréter des interleukines qui vont stimuler à leur tour les lymphocytes B (11). Ces mêmes lymphocytes B vont alors produire des auto-anticorps et vont agir sur les fibroblastes et les lymphocytes T conduisant à une boucle d'activation.

Les fibroblastes dans la maladie de Basedow présentent un récepteur à l'IGF1 avec un niveau d'expression plus important participant aussi à l'inflammation orbitaire (12).

Au total, cette boucle d'activation entraîne une infiltration inflammatoire de l'orbite et des muscles oculomoteurs, avec augmentation du compartiment graisseux et du volume musculaire. Cette inflammation est limitée dans le temps, pour une durée spontanée de 12 à 18 mois et expose à des complications oculaires.

### **C. Clinique**

Approximativement la moitié des patients présentant une maladie de Basedow développent une orbitopathie à différents degrés de sévérité (13). L'orbitopathie se développe le plus souvent dans les mois précédant ou suivant l'apparition de la dysthyroïdie (14).

Le suivi biologique de l'activité thyroïdienne est important dans la maladie de Basedow grâce au dosage de la TSH et des hormones libres T3 et T4. Le dosage des anticorps TRAK est utilisé pour le diagnostic spécifique de la maladie de Basedow. C'est aussi un facteur pronostic important dans l'orbitopathie de Basedow (15) (16). Si le taux reste élevé à l'arrêt du traitement, la rechute est plus fréquente (17).

L'activité de l'orbitopathie de Basedow est définie selon le *Clinical Activity Score* (18) qui comprend des critères cliniques et symptomatologiques d'inflammation. A partir d'un score de 3 sur 7 l'orbitopathie est définie comme active, à contrario de la forme inactive qui ne nécessite pas d'adaptation thérapeutique.

### **Clinical Activity Score** (18)

Douleur rétrobulbaire spontanée : 1 point.

Douleur lors des mouvements oculaires vers le haut ou le bas : 1 point.

Rougeur des paupières : 1 point.

Hyperhémie conjonctivale : 1 point.

Œdème palpébral : 1 point.

Inflammation de la caroncule et/ou du pli semi-lunaire : 1 point.

Chémosis : 1 point.

Un CAS supérieur ou égal à 3 sur 7 indique une activité de l'orbitopathie de Basedow

Cinq atteintes oculaires différentes sont possibles dans l'orbitopathie de Basedow, classées ici par ordre de sévérité croissant.

#### Troubles de la surface oculaire

Il s'agit de signes inflammatoires de la surface cornéenne (sécheresse oculaire, kératite) ou de la conjonctive (chémosis, hyperhémie conjonctivale, inflammation caronculaire). L'atteinte est souvent bilatérale, possiblement asymétrique.

#### Troubles palpébraux

Après les troubles de surface oculaire, c'est l'atteinte la plus fréquente de l'orbitopathie de Basedow (19). Il s'agit de rétraction palpébrale supérieure ou inférieure. Il existe trois stades de sévérité de la rétraction palpébrale :

- Rétraction mineure : la paupière supérieure ou inférieure est éloignée du limbe de moins de 2 millimètres.
- Rétraction moyenne : la paupière supérieure est éloignée de 2 à 6 millimètres du limbe ou la paupière inférieure est éloignée du limbe de plus de 3 millimètres.
- Rétraction sévère : la paupière supérieure est éloignée de plus de 6 millimètres du limbe ou la paupière inférieure est éloignée du limbe de plus de 4 millimètres.

La rétraction peut être primaire par infiltration musculaire ou secondaire par fibrose. La différence entre les deux s'établit par une augmentation de la rétraction dans le regard vers le bas pour la cause primaire et l'inverse pour la cause secondaire.

L'asynergie oculo-palpébrale de Von Graefe est un signe pathognomique qui consiste en un retard d'action de la paupière supérieure lors du regard inférieur dû à la rétraction palpébrale supérieure.

### Troubles oculomoteurs

L'atteinte oculomotrice est initialement inflammatoire puis séquellaire par fibrose. Par ordre de fréquence le muscle droit inférieur est le plus souvent atteint, suivi du droit médial, du droit supérieur et enfin rarement du droit latéral. Ainsi la limitation oculomotrice la plus fréquente est l'atteinte de l'élévation, causant une diplopie binoculaire verticale.

### Exophtalmie

L'exophtalmie est le plus souvent bilatérale, symétrique ou non, axile, non pulsatile et non réductible. Elle consiste en une protrusion du globe oculaire par une inadéquation du volume du contenu de l'orbite par rapport au cadre orbitaire qui est inextensible.

Associée aux troubles de surface et aux rétractions palpébrales, elle peut entraîner une kératopathie d'exposition voire une surinfection.

### Neuropathie compressive

Il s'agit d'une menace majeure par compression du nerf optique ou de ses vaisseaux suite à l'élargissement des muscles oculomoteurs à l'apex. Elle n'est pas liée à la sévérité de l'exophtalmie et peut même avoir lieu en absence d'exophtalmie par hypertrophie des muscles oculomoteurs (20).

Plusieurs arguments sont évocateurs d'une neuropathie optique compressive : la baisse d'acuité visuelle, l'œdème papillaire au fond d'œil et l'altération des examens paracliniques (atteinte des RNFL en OCT, atteinte du champ visuel avec un scotome paracentral ou une réduction concentrique, altération de la vision des couleurs dans l'axe rouge-vert).

C'est une urgence thérapeutique nécessitant une imagerie et un traitement immédiat par bolus de glucocorticoïdes plus ou moins associé à une technique chirurgicale de décompression en fonction de la sévérité et de la réponse au traitement.

## **D. Traitements**

Dans la maladie de Basedow comme dans l'orbitopathie l'arrêt du tabac est nécessaire. En effet il existe une relation dose-dépendant entre le nombre de cigarettes fumées par jour et la probabilité de développer une orbitopathie de Basedow (21). De même l'effet thérapeutique est moindre sans arrêt du tabac (22).

Toutes les orbitopathies de Basedow doivent bénéficier d'un traitement médical, classiquement un antithyroïdien, pour un équilibre de la fonction thyroïdienne. Les patients non équilibrés sont plus à risque de développer une orbitopathie de Basedow (23). Aucune supériorité de traitement antithyroïdien par rapport à un autre n'a été prouvée dans l'évolution de l'orbitopathie (12). Une fois arrivé au stade d'euthyroïdie

deux protocoles d'entretien sont possibles (17) : l'utilisation d'un antithyroïdien seul à dose minimale ou l'utilisation d'un traitement combiné par antithyroïdien et levothyroxine. Dans les deux cas le dosage des traitements doit être adapté aux résultats biologiques. Ce protocole combiné permettrait d'obtenir une stabilité thyroïdienne, mais une étude retrospective a montré une absence de différence significative entre les deux protocoles (24). Comme il n'y a pas eu d'évidence de supériorité d'action d'un protocole par rapport à l'autre, le choix est donc libre au clinicien (17). En cas d'échec du traitement ou de récurrence à l'arrêt (classiquement le traitement est arrêté après 18 mois), le clinicien peut proposer une thyroïdectomie ou un traitement par iodothérapie. Un traitement hormonal substitutif associé sera alors nécessaire au long cours. Si un traitement par iodothérapie est initié, il est recommandé que les patients bénéficient d'une cure courte de corticoïdes concomitante pour éviter une dégradation de l'orbitopathie (17).

La prise en charge thérapeutique est ensuite guidée selon le score d'activité CAS qui distingue les orbitopathies actives nécessitant un traitement des orbitopathies inactives. Le choix de thérapeutique dépend de la classification EUGOGO qui évalue la sévérité de l'orbitopathie de Basedow (25).



## Classification EUGOGO

### **Orbitopathie menaçant le pronostic visuel (urgence thérapeutique)**

- Neuropathie optique
- Atteinte cornéenne sévère

### **Orbitopathie modérée à sévère**

- Impact sur la vie quotidienne suffisamment important pour justifier d'une immunosuppression (si active) ou d'une chirurgie (si inactive)
- Rétraction palpébrale  $\geq 2$  mm
- Atteinte modérée à sévère des tissus mous orbitaires
- Exophtalmie  $\geq 3$  mm par rapport à la normale
- Diplopie inconstante ou constante

### **Orbitopathie légère**

- Impact mineur sur la qualité de vie ne justifiant pas un traitement immunosuppresseur ou une intervention chirurgicale
- Rétraction palpébrale mineure  $< 2$  mm
- Atteinte légère des tissus mous orbitaires
- Exophtalmie  $< 3$  mm par rapport à la normale
- Absence de diplopie ou diplopie intermittente
- Atteinte cornéenne mineure, répondant au traitement topique par lubrifiants

Pour les orbitopathies légères, un traitement oculaire local avec des larmes artificielles et des soins de paupières quotidiens est suffisant. Un traitement par sélénium peut diminuer la progression de la maladie et la symptomatologie du patient par son effet antioxydant. La posologie retenue est de 100 microgrammes deux fois par jour pendant 6 mois (26).

Pour les orbitopathies modérées à sévères, plusieurs traitements médicaux sont disponibles. Des bolus de glucocorticoïdes peuvent être administrés avec une posologie de 500 mg par semaine pendant six semaines consécutives, puis diminuée à 250 mg par semaine lors des six semaines suivantes (12). Les mesures adjuvantes à la corticothérapie sont associées avec réduction de l'apport salé, surveillance de la tension artérielle et de la glycémie et prévention du risque ostéoporotique et gastrique si nécessaire. Les patients ayant une mauvaise réponse aux bolus de glucocorticoïdes après 6 semaines peuvent être dirigés vers un traitement de seconde ligne car la réponse précoce est un élément prédictif de l'efficacité du traitement (27). Des immunosuppresseurs peuvent être utilisés en seconde ligne en cas d'inefficacité des glucocorticoïdes ou de contre-indication. La radiothérapie externe peut aussi être pratiquée en complément des bolus de glucocorticoïdes. La dose cumulée est généralement de 20 Gray par orbite, fractionnée en dix séances sur une période de deux semaines. Cependant la radiothérapie peut provoquer une cataracte souvent plus précoce (28) et peut exposer au risque de kératite post radique.

Le traitement chirurgical par décompression orbitaire est proposé en cas de menace visuelle par neuropathie optique compressive ou d'exophtalmie compliquée si la réponse aux bolus de corticoïdes est insuffisante. Il est aussi généralement indiqué « à froid » lors d'une exophtalmie résiduelle séquellaire après obtention d'un équilibre thyroïdien sur plusieurs mois (au moins 6 mois). La décompression orbitaire consiste en un effondrement d'une ou de plusieurs parois de l'orbite, plus ou moins associé à une lipectomie.

Le plan de traitement chirurgical doit toujours suivre un ordre particulier car chaque intervention peut interférer sur la suivante. En premier doit avoir lieu la décompression orbitaire si elle s'avère nécessaire, puis la correction de troubles oculomoteurs, suivi de la correction de la statique palpébrale.

## **E. Le métabolome**

L'approche métabolomique étudie l'ensemble des métabolites trouvés dans un échantillon biologique. Les métabolites sont des petites molécules de masse usuellement inférieure à 1500 Da comme les sucres, les acides aminés, les lipides, les nucléotides, les vitamines, etc.

Le métabolome est la réponse finale d'un organisme à une pathologie ou à toute perturbation de l'expression du génome.

Plusieurs études sont possibles, soit une forme non ciblée qui analyse le profil entier des métabolites ou une forme ciblée sur un ensemble de métabolites.

Les deux principales techniques utilisées sont la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire et surtout la spectrométrie de masse, qui a l'avantage d'une très grande sensibilité et d'une capacité à détecter un grand nombre de métabolites de façon simultanée. Les données sont analysées par la suite via des statistiques uni- ou multi-variées.

La recherche d'une signature métabolomique a été utilisée dans de multiples pathologies ophtalmologiques allant du glaucome (29) aux neuropathies optiques (30).

## **F. Le film lacrymal**

Le film lacrymal est une fine couche couvrant la surface de l'œil et qui est l'interface entre l'œil et son environnement. Il a un rôle nutritif, protecteur et réfractif. Le volume du film lacrymal est d'environ 7 à 9  $\mu\text{L}$  avec une sécrétion de 1 à 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  (31).

Le film lacrymal est constitué de trois couches intriquées dont chacune a son propre rôle.

La couche la plus externe, la plus fine, est la couche lipidique. Elle est constituée d'un mélange de triglycérides, d'acides gras libres, de di-esters de cholestérol, de cires et de cholestérols libres sécrétés majoritairement par les glandes de Meibomius. Elle a pour fonction principale de stabiliser le film lacrymal en diminuant l'évaporation, de limiter les contaminations extérieures et de fournir une surface réfractive lisse.

La couche intermédiaire, la plus épaisse, est la couche aqueuse. Elle constitue à peu près 90% du film lacrymal. Elle est constituée d'électrolytes, de facteurs de croissance, d'hormones, d'immunoglobulines, de cytokines et de cellules inflammatoires. Elle est produite par la glande lacrymale principale (larmolement réflexe) et par les glandes lacrymales accessoires (larmolement spontané). Elle a pour fonction de lubrifier la surface oculaire, d'apporter les nutriments à la cornée et d'être antimicrobienne grâce à sa concentration en anticorps, lysozyme, lactoferrine, etc.

La couche la plus interne est la couche mucinique. Elle est produite par les cellules caliciformes de l'épithélium conjonctival. Elle a pour fonction de réduire les frictions sur les cellules épithéliales au clignement.

### **G. Lien entre métabolome et larmes.**

Les premiers articles relatant l'étude du métabolome des larmes apparaissent au début des années 2010 avec la découverte d'une soixantaine de métabolites différents (32). La difficulté primaire consistait en un volume d'analyse des larmes très limité et donc compliqué à analyser en chromatographie. L'analyse métabolomique a d'abord surtout porté sur la sécheresse oculaire avec de nombreuses études prouvant des spécificités métabolomiques (33). Une étude thérapeutique a même été menée, basée sur la modification du profil métabolomique des larmes de patients atteints de sécheresse oculaire avant et après traitement par antioxydants (34). La recherche métabolomique s'est ensuite étendue aux pathologies systémiques inflammatoires. Dans une étude concernant la sclérose en plaques, une modulation des

phospholipides et des sphingomyélines au niveau des larmes a été prouvée et le potentiel diagnostique de certains acides aminés et d'acylcarnitines a commencé à être évoqué (35). Le profilage métabolomique s'est aussi intéressé aux pathologies ophtalmologiques tel que le glaucome où il a été mis en évidence une diminution de plusieurs acides aminés, d'acétylcarnitines et de lysophospholipides (36). Des liens physiopathologiques ont ainsi été établis : l'acétylcarnitine ayant par exemple un effet neuroprotecteur et anti-apoptotique, sa diminution dans la neuropathie glaucomateuse semble bien corrélée. Récemment des biomarqueurs métabolomiques ont également été découverts dans les larmes de patients atteints de la maladie de Gougerot-Sjögren permettant la différenciation avec les autres syndromes secs (6).

Ces études du profil métabolique des larmes ont au final plusieurs utilités : elles permettent de mettre en évidence de potentiels biomarqueurs de certaines maladies de diagnostic difficile (tel que la maladie de Gougerot-Sjögren) et de découvrir de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques.

## ARTICLE

# A tear metabolomic profile showing the involvement of spermine in thyroid-associated orbitopathy

Benjamin Billiet,<sup>1</sup> Juan Manuel Chao de la Barca,<sup>3</sup> Marc Ferré,<sup>3</sup> Jeanne Muller,<sup>1</sup> Anaïs Vautier,<sup>1</sup> Sophie Assad,<sup>1</sup> Odile Blanchet,<sup>4</sup> Lydie Tessier,<sup>2</sup> Céline Wetterwald,<sup>2</sup> Justine Faure,<sup>2</sup> Geoffrey Urbanski,<sup>3</sup> Gilles Simard,<sup>2</sup> Delphine Mirebeau-Prunier,<sup>3</sup> Patrice Rodien,<sup>3,6</sup> Philippe Gohier,<sup>1</sup> Pascal Reynier<sup>2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Département d'Ophtalmologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU), F-49000 Angers, France

<sup>2</sup>Service de Biochimie et biologie moléculaire, Centre Hospitalier Universitaire, F-49000 Angers, France

<sup>3</sup>Université d'Angers, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche (UMR) MITOVASC, Structure Fédérative de Recherche (SFR) ICAT, F-49000 Angers, France

<sup>4</sup>CHU Angers, Centre de Ressources Biologiques, BB-0033-00038, F-49000 Angers, France

<sup>5</sup>Service de Médecine Interne et d'Immunologie Clinique, Centre Hospitalier Universitaire, F-49000 Angers, France

<sup>6</sup>Service d'Endocrinologie, Centre Hospitalier Universitaire, F-49000 Angers, France

**\*Correspondence to:** Pascal Reynier, MD, PhD; email: pareynier@chu-angers.fr

**Word count:** Title: 95 characters including spaces; **Abstract:** 223 words; **Total word count** excluding title page, abstract, figure legends and references: 2260 words; **Figures:** 1; **Tables:** 2; **Supplementary files:** 2.

**Keywords:** Graves' ophthalmopathy; Metabolomics; Ornithine decarboxylase; Spermine; Thyroid-associated orbitopathy.

### Abbreviations:

CAS: clinical activity score; OCT: ornithine carbamoyltransferase; ODC: ornithine decarboxylase; TAO: thyroid-associated orbitopathy; TRAb: thyroid receptor autoantibodies; TSH: thyroid stimulating hormone.

## ABSTRACT

**PURPOSE.** About half of patients with Graves' disease develop an orbitopathy related to an inflammatory expansion of periorbital adipose tissue and muscles.

**METHODS.** We used a targeted metabolomics approach to compare the metabolic composition of tears in patients with active ( $n = 21$ ) *versus* inactive ( $n = 24$ ) thyroid-associated orbitopathy, using the Biocrates Absolute IDQ p180 kit to measure 188 metabolites by mass spectrometry.

**RESULTS.** Among the 44 metabolites accurately measured, eight showed significant altered concentrations between the two compared groups. Two short-chain acylcarnitines (propionylcarnitine and butyrylcarnitine) and spermine showed relative increased concentrations in patients with active orbitopathy, whereas ornithine, glycine, serine, citrulline and histidine were relatively decreased in this group. In addition, the ratio putrescine/ornithine representing the activity of ornithine decarboxylase was significantly increased in patients with active orbitopathy when compared with patients with inactive orbitopathy ( $p = 0.0011$ , fold change 3.75); and the specificity of this biomarker was maintained when compared to a control group with unclassified dry eye.

**CONCLUSIONS.** This metabolic signature strongly suggests a pathophysiological mechanism involving the stimulation of ornithine decarboxylase by TSH receptor autoantibodies in orbital fibroblasts, leading to increased spermine synthesis. The proliferative properties of spermine may contribute to the periorbital increased myogenesis and adipogenesis that characterize thyroid-associated orbitopathy. Our results suggest a metabolic circuit that could both provide a new therapeutic target and a candidate biomarker for Graves' ophthalmopathy.

## INTRODUCTION

Thyroid-associated orbitopathy (TAO), or Graves' ophthalmopathy, has an estimated prevalence of 1/1000 in Europe<sup>1</sup> and more frequently affects women (5 women for every man) between 40 and 50 years, as explained by the epidemiology of Graves' disease itself. Hyperthyroidism in Graves' disease results from an over-stimulation of the thyroid cells by TSH receptor autoantibodies, resulting in the increased secretion of thyroid hormones.<sup>2</sup> TAO is also directly caused by these autoantibodies, which stimulate the orbital fibroblasts that express the TSH receptor. Activated fibroblasts differentiate into myofibroblasts and adipocytes.<sup>3</sup> The myofibroblasts secrete glycosaminoglycans in oculomotor muscles, leading to their increased volume. In parallel, neoadipogenesis causes an expansion of the fat volume in the orbit. Other cells, such as activated lymphocytes T and B, which secrete pro-inflammatory cytokines, are also effectors of this orbital inflammation.

Approximately half of patients with Graves' disease develop an orbitopathy, which most often occurs in the months before or after the onset of dysthyroidism.<sup>4</sup> This ocular damage can be manifested by a dry and gritty ocular sensation, photophobia, sensation of excessive tearing, diplopia and a sensation of pressure behind the eyes.<sup>2</sup> On clinical examination, proptosis, restricted ocular motility, eyelid retraction, palpebral edema and erythema of the periorbital tissues may be present. TAO can be complicated by severe pain, corneal ulceration, or compressive optic neuropathy, leading to a risk of vision loss. Smoking is a significant risk factor for TAO in patients with Graves' disease.<sup>5</sup>

The management of TAO depends on its severity. The EUGOGO guidelines distinguish mild from moderate/severe orbitopathy.<sup>6</sup> The Clinical Activity Score proposed by Mourits et al. is based on clinical signs of inflammation and helps to differentiate active TAO needing treatment from inactive TAO.<sup>7</sup> The management of TAO is primarily based on the treatment of dysthyroidism, the elimination of tobacco use, as well as local symptomatic treatments. Treatment of dysthyroidism is based on synthetic antithyroid drugs and may be reinforced by surgery or radiotherapy. Severe forms of TAO require systemic corticosteroid therapy, sometimes followed by radiotherapy and even immunosuppressive drugs.

Few metabolomic studies have focused on the specificity of the ophthalmologic involvement in Graves' disease. A study of the blood metabolomic profile in Graves' disease identified ten discriminating metabolites, most of which showed a positive correlation with thyrotropin receptor antibodies.<sup>8</sup> In this study, only two blood metabolites, proline and 1,5-anhydroglucitol, were found



to be discriminating in the presence of orbitopathy. In addition, in comparison with healthy controls, patients with orbitopathy showed a specific profile in the orbital adipose/connective tissues in which fumarate, proline, phenylalanine and glycerol were coordinately altered with the blood metabolites.

The search for tear biomarkers in ocular diseases has gained considerable attention with the advent and increased sensitivity of omics approaches.<sup>9</sup> Tears have a protective, nourishing and lubricating role on the ocular surface. They are composed of three layers, an outer lipid layer produced by the meibomian glands in contact with the air, an intermediate layer produced by the lacrimal glands with an aqueous composition and an inner layer produced by the goblet cells composed of mucus in contact with the epithelial surface.<sup>10</sup> Tears contain hundreds of compounds including ions, carbohydrates, lipids, proteins, as well as various metabolite families. Proteomic studies of tears have revealed strong alterations of cytokines and pro-inflammatory factors in TAO.<sup>9</sup> To our knowledge, no metabolomic studies have been reported so far in tears of patients with TAO, in contrast to other causes of dry eye disease that have been much more studied, showing sharp metabolic alterations.<sup>10</sup>

Here, we present a targeted quantitative metabolomics approach, comparing the metabolic composition of tears in patients with active versus inactive TAO.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study participants**

Participants were included in the study after having given their informed written consent for the research. The study was conducted according to the ethical standards of the Helsinki Declaration and its later amendments, and with the approval of the ethical committee (Comité de Protection des Personnes, CPP-OUEST 2), agreement number: CB 2013-04.

Individuals were prospectively recruited during routine consultation in the Department of Ophthalmology of the Angers University Hospital, France from June 2019 to October 2020. All included patients were diagnosed with Graves' ophthalmopathy by an ophthalmologist together with an endocrinologist. Patients were divided into two groups according to their Clinical Activity Score (CAS).<sup>7</sup> Patients with a CAS greater than or equal to 3 were included in the "active TAO" group (n = 21) and those with a CAS less than 3 in the "inactive TAO" group (n = 24). They had their past ophthalmic history recorded and their clinical assessment included. Clinical parameters collected were CAS criteria (spontaneous retrobulbar pain, pain with upward or downward eye movements, redness of the eyelids, conjunctival hyperemia, palpebral edema, inflammation of the caruncle and/or semilunar fold, and chemosis), visual acuity, presence or absence of optic disc edema, tear film break-up time measurement, smoking activity, medical and ophthalmologic history and systemic and ophthalmologic medications were also recorded. Previous treatments for severe Graves' disease have also been recorded, including corticosteroids, radiotherapy and thyroidectomy. The paraclinical parameters collected were the Schirmer strip imbibition measurement in millimeters, TSH/T3/T4 and TSH receptor autoantibodies (TRAb) plasma levels. Exclusion criteria were concomitant other ophthalmic and thyroid diseases.

An independent control collection of tears from individuals (n = 20) with an objective eye dryness of unknown origin was further used to address the specificity of the putrescine/ornithine ratio. Objective eye dryness was defined with an Oxford score higher than 1 and/or a Schirmer I test  $\leq 5$  mm / 5 min and/or a break-up time (BUT) test  $< 10$  seconds on at least one eye.

### **Tear sampling and metabolite extraction**

The Schirmer test was performed in fasting patients in the morning using Schirmer-Plus strips (GECIS®, France) in sterile conditions, placed at the 2-3/1-3 outer junction of the lower eyelid and left in place for 5 minutes, without prior local anesthetic. The tear-soaked strips were then placed in Eppendorf® tubes, which were immediately transferred in liquid nitrogen, before being sent to the Biological Resource Center for conservation at -80°C.

A tear volume of 15  $\mu$ L was collected as described<sup>11</sup> by cutting the soaked strips at 21 mm from their edge. Strips were then transferred in precooled 2.0 ml homogenization Precellys tubes (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) prefilled with 1.4 mm diameter ceramic beads and 20  $\mu$ L of cold methanol. Strips were homogenized by two grinding cycles, each at 6,500 rpm for 30 seconds, spaced 20 seconds apart, using a Precellys® homogenizer kept at +4°C. The supernatant containing the metabolites was recovered after centrifuging at 20 000 g for 10 minutes of the homogenate and kept at -80°C until analysis.

### **Metabolite analysis**

We applied a targeted, quantitative metabolomic approach to the tear extracts using the Biocrates® AbsoluteIDQ p180 kit (Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Austria) and an AB Sciex QTRAP 5500 (Life Sciences Holdings, Villebon-sur-Yvette, France) mass spectrometer as previously described.<sup>11</sup> This kit, in combination with an AB Sciex QTRAP 5500 (SCIEX, Villebon sur Yvette, France) mass spectrometer, enables quantification of up to 188 different endogenous molecules, including 40 acylcarnitines, 21 amino acids, 21 biogenic amines, 90 glycerophospholipids, 15 sphingolipids and the sum of hexoses.

### **Statistical analysis**

After validation of the three levels of quality control used with the kit, the metabolite concentrations were used for statistical analysis only if they were in the quantitation range determined by the calibration curves. Indeed, metabolites with more than 20% of their values outside of the quantitation range (i.e., concentration above the upper limit of quantitation or below the lower limit of quantitation) were not considered. Before excluding a given metabolite with more than 20% but less than 40% outside of the quantitation range from statistical analysis, a  $\chi^2$  test was performed with the independence between in/out of range and active/inactive TAO properties as the null hypothesis.

A Student t test was used to compare metabolite concentrations between active and inactive TAO groups. A non-parametric Mann-Whitney-Wilcoxon test was applied for comparing metabolite ratios between groups whilst a Student t test was used for comparisons involving metabolite sums. *P*-values less than  $\alpha = 0.05$  were considered significant.

## **RESULTS**

### **Clinical description**

The demographic and clinical data of the two groups of patients included in this study are presented in Table 1. There were no differences in age, sex, morbidity and thyroid status between the two groups, except for a higher proportion of active smokers in the inactive CAT group. As expected, the Oxford score and the clinical activity score were significantly different between the two groups.

**Table I.** Demographic and clinical status of individuals with active and inactive thyroid-associated orbitopathy.

	Active (n = 21)	Inactive (n = 24)	p-value
<i>Demographic data</i>			
Women (%)	76% (16/21)	75% (18/24)	0.93
Mean age (y)	55	51	0.42
Past smoker (%)	42% (5/12)	48% (10/21)	0.74
Active smoker (%)	0% (0/12)	33% (7/21)	<b>0.02</b>
Diabetes (%)	10% (2/21)	4% (1/24)	0.47
Hypertension (%)	19% (4/21)	13% (3/24)	0.55
Hyperlipidemia (%)	5% (1/21)	4% (1/24)	0.92
<i>Graves' disease features</i>			
TRAb positivity (%)	95% (19/20)	76% (13/17)	0.10
Mean TSH (mUI/L)	3.43	2.84	0.75
Mean fT4 (pmol)	12.35	15.44	0.28
Radiotherapy (%)	14% (3/21)	17% (4/24)	0.83
Corticosteroid (%)	38% (8/21)	37% (9/24)	0.97
Thyroidectomy (%)	19% (4/21)	25% (6/24)	0.63
Duration of dysthyroidism (months)	41	50	0.64
Antithyroid drugs (%)	75% (15/20)	54% (13/24)	0.15
Thyroid hormones (%)	55% (11/20)	71% (17/24)	0.28
<i>Ophthalmological features</i>			
Clinical Activity Score	3.67	0.82	<b>7.82e-13</b>
Oxford score	0.43	0.08	<b>0.01</b>
Mean visual acuity (log mar)	0.079	0.065	0.68
Mean Schirmer imbibition (mm)	35	32	0.19

### Altered metabolite concentrations

From the 188 metabolites measured, 44 were found to be correctly measured. Supplementary Table 1 shows these 1980 concentrations of metabolites measured in tears of the 45 individuals. Of these 44 metabolites, eight were found to be significantly altered in the active compared to the inactive orbitopathy (Table 2). The polyamine spermine showed increase levels in active TAO ( $p = 0.0074$ , fold change 1.34), as well as two short-chain acylcarnitines, propionylcarnitine (C3,  $p = 0.0232$ , fold change 1.77) and butyrylcarnitine (C4,  $p = 0.0176$ , fold change 1.54). Five amino acids showed decreased concentrations, ornithine ( $p = 0.0189$ , fold change 0.43), glycine ( $p = 0.0235$ , fold change 0.45), serine ( $p = 0.0278$ , fold change 0.38), citrulline ( $p = 0.0281$ , fold change 0.23) and histidine ( $p = 0.0336$ , fold change 0.45). Finally, among the sums and ratios of metabolites with functional importance proposed by Biocrates, one was significantly modified: the ratio of putrescine to ornithine, which represents the activity of ornithine decarboxylase (ODC), showed an increased value in active TAO ( $p = 0.0011$ , fold change 3.75).

**Table II.** List of metabolites with significant modification of concentrations in tears of patients with active compared to inactive orbitopathy.

Metabolites	<i>p</i> -values	Fold changes
Spermine	0.0074	1.34
Butyrylcarnitine (C4)	0.0176	1.54
Ornithine	0.0189	0.43
Propionylcarnitine (C3)	0.0232	1.77
Glycine	0.0235	0.45
Serine	0.0278	0.38
Citrulline	0.0281	0.23
Histidine	0.0336	0.45
<b>Ratio</b>		
Putrescine/Ornithine (ornithine decarboxylase activity)	0.0011	3.75

To address the specificity of the putrescine/ornithine ratio in the active form of TAO, an independent control group of tears from individuals ( $n = 20$ ) with dry eye of undetermined origin was used. The demographic and clinical data of these control patients are presented in Supplementary Table 2. The majority of these patients have been included in this group on the basis of an altered Break Up Time test. The specificity of this increased ratio in active TAO was confirmed since it remained significantly increased in active TAO compared to this control group ( $p = 0.02$ , fold change, without significant difference ( $p = 0.12$ ) when comparing inactive TAO with this control group.

**Table III.** Demographic and clinical status of individuals with dry eye of undetermined origin.

NA: not available.

	<b>Controls (n = 20)</b>
Women (%)	80%
Mean age (y)	55
Mean Schirmer imbibition (mm)	34.6
Past smoker (%)	36%
Active smoker (%)	27%
Diabetes (%)	25%
Hypertension (%)	25%
Hyperlipidemia (%)	0%
TRAb positivity (%)	NA
Mean TSH (mUI/L)	NA
Mean fT4 (pmol)	NA
Radiotherapy (%)	NA
Corticosteroid (%)	NA
Thyroidectomy (%)	NA
Duration of dysthyroidism (months)	NA
Oxford score	0.15
Mean visual acuity (log mar)	0.1475
Clinical Activity Score	NA

## DISCUSSION

Our study reveals an alteration to eight metabolite concentrations and one enzymatic activity in the tears of patients with active compared to inactive TAO.

The increase in concentrations of **two short-chain acylcarnitines** is interesting because the return to a euthyroid stage after three months of treatment of Graves' disease has previously been associated with a decrease in blood concentrations of short-chain acylcarnitines.<sup>12</sup> Our study reveals that in tears, active and inactive forms of thyroid orbitopathy are also distinguished by altered concentrations of short-chain acylcarnitines. These metabolites are related to the catabolism of glucose and amino acids rather than the oxidation of fatty acids, as is the case with medium- and long-chain acylcarnitines. Therefore, the increase in periorbital short-chain acylcarnitines may reflect an increased oxidative catabolism of glucose and amino acids to meet the higher energy requirements of activated fibroblasts in active TAO.

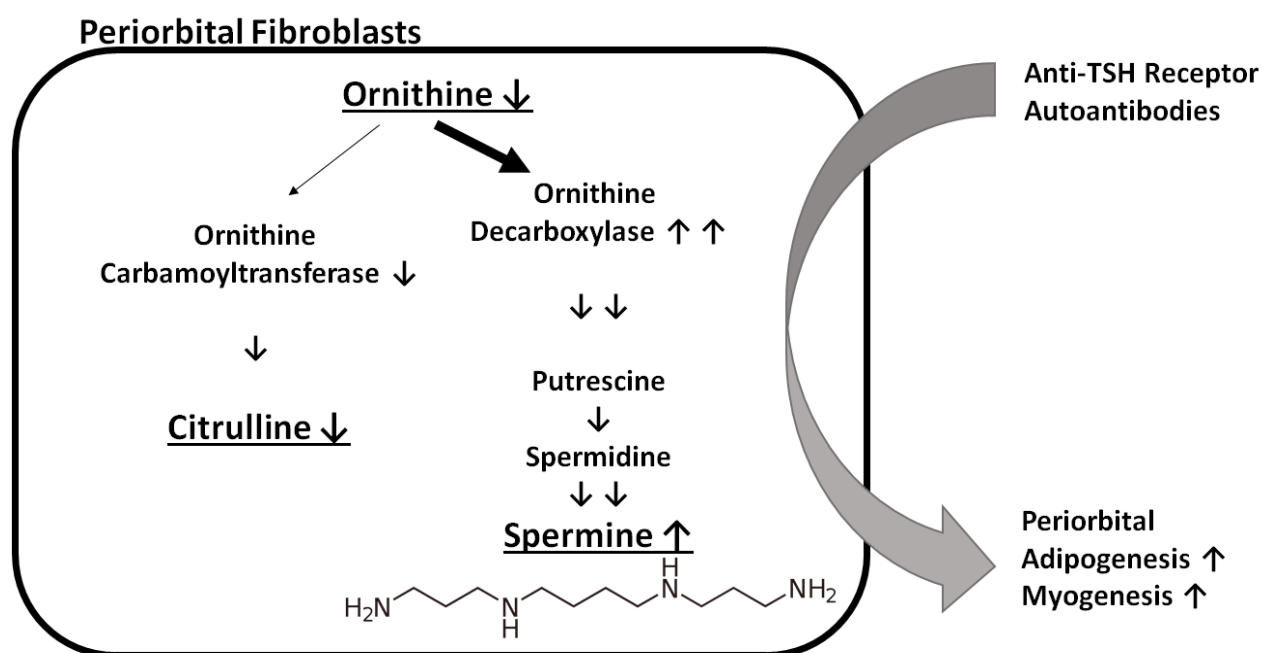
**Ornithine decarboxylase** (ODC) catalyzes the decarboxylation of ornithine leading to the formation of putrescine. The putrescine/ornithine ratio, increased by 3.75 times in the tears of patients with active TAO, shows the increased activity of this enzyme in the ocular environment. Consistently, ornithine, the substrate of this enzyme, was found to be decreased in our study. ODC catalyze the first regulatory step of the synthesis of polyamines, i.e., putrescine, spermidine and spermine. The polyamines are important for the stabilization, repair and expression of DNA, and have a proliferative role.<sup>13</sup> Our results consistently show an increase in the concentration of **spermine** in active TAO tears, spermidine not being measurable in our study and putrescine showing only a trend toward increased concentration ( $p = 0.061$ ). It is known that, in rats, thyroid ornithine decarboxylase is strongly stimulated by TSH,<sup>14,15</sup> leading to increased levels of polyamines with a proliferative role in goiter and tumor formation.<sup>16,17</sup> As orbital fibroblasts themselves possess TSH receptors, playing a pathophysiological role in TAO, it is tempting to propose that the increased synthesis of spermine could also be directly related to the overstimulation by Graves' autoantibodies and could play a proliferative role at the origin of the increased myogenesis and adipogenesis observed in orbitopathy. Indeed, fibroblasts also possess ornithine decarboxylase and polyamines are known to stimulate both myogenesis and adipogenesis.<sup>18,19</sup> In this context, the putrescine/ornithine ratio in tears, the most significant parameter in our study, could be an excellent candidate biomarker of TAO severity.



In our study, **citrulline** was found to be lower in the tears of active forms of TAO. Citrulline is also derived from ornithine through another reaction catalyzed by ornithine carbamoyltransferase (OCT). It is therefore tempting to propose that ornithine could be preferentially oriented to polyamine production through ODC over-stimulation at the expense of citrulline production through the OCT, explaining its lower concentration in tears.

We did not identify a clear relationship in the literature with the other three amino acids whose concentrations were found to be lowered in the tears of active TAO, namely **glycine**, **histidine** and **serine**.

In conclusion, the metabolic signature observed in the tears of active forms of TAO, compared to inactive ones, suggests an attractive pathophysiological mechanism involving increased spermine synthesis that deserves further investigation (Figure 1). This metabolic circuit could therefore constitute a local therapeutic target of choice for moderate or severe forms of TAO, and ODC inhibitors could be studied for their antiproliferative properties. Lastly, the ratio of putrescine to ornithine in tears could be an excellent candidate biomarker of TAO activity and severity.



**Figure 1.** Pathophysiological model suggested by the tear metabolic signature obtained in active versus inactive TAO.

## Acknowledgments

We are thankful to the individuals participating in this study. We acknowledge support from the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)*, the *Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)*, the *University of Angers*, and the *Angers University Hospital*.

Disclosure: B. Billiet, None; J.M. Chao de la Barca, None; M. Ferré, None; A. Vautier, None; S. Assad, None; O. Blanchet, None; L. Tessier, None; C. Wetterwald, None; J. Faure, None; G. Urbanski, None; G. Simard, None; D. Mirebeau-Prunier, None; P. Rodien, None; P. Gohier, None; P. Reynier, None

## References

1. Perros P, Hegedüs L, Bartalena L, et al. Graves' orbitopathy as a rare disease in Europe: a European Group on Graves' Orbitopathy (EUGOGO) position statement. *Orphanet J Rare Dis*. 2017;12:72.
2. Bahn RS. Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med*. 2010;362:726–38.
3. Smith TJ. Potential role for bone marrow-derived fibrocytes in the orbital fibroblast heterogeneity associated with thyroid-associated ophthalmopathy. *Clin Exp Immunol*. 2010;162:24–31.
4. Bartley GB, Fatourehchi V, Kadrmas EF, et al. Chronology of Graves' ophthalmopathy in an incidence cohort. *Am J Ophthalmol*. 1996;121:426–34.
5. Prummel MF, Wiersinga WM. Smoking and risk of Graves' disease. *JAMA*. 1993;269:479–82.
6. Bartalena L, Kahaly GJ, Baldeschi L, et al. The 2021 European group on Graves' orbitopathy (EUGOGO) clinical guidelines for the medical management of Graves's orbitopathy. *Eur J Endocrinol*. 2021:EJE-21-0479.R1.
7. Mourits MP, Prummel MF, Wiersinga WM, Koornneef L. Clinical activity score as a guide in the management of patients with Graves' ophthalmopathy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1997;47:9–14.
8. Ji DY, Park SH, Park SJ, et al. Comparative assessment of Graves' disease and main extrathyroidal manifestation, Graves' ophthalmopathy, by non-targeted metabolite profiling of blood and orbital tissue. *Sci Rep*. 2018;8:9262.
9. Hagan S, Martin E, Enríquez-de-Salamanca A. Tear fluid biomarkers in ocular and systemic disease: potential use for predictive, preventive and personalised medicine. *EPMA J*. 2016;7:15.
10. Yazdani M, Elgstøen KBP, Rootwelt H, Shahdadfar A, Utheim ØA, Utheim TP. Tear Metabolomics in Dry Eye Disease: A Review. *Int J Mol Sci*. 2019;20:3755.
11. Urbanski G, Assad S, Chabrun F, et al. Tear metabolomics highlights new potential biomarkers for differentiating between Sjögren's syndrome and other causes of dry eye. *Ocul Surf*. 2021;22:110–116.

12. Al-Majdoub M, Lantz M, Spéjel P. Treatment of Swedish Patients with Graves' Hyperthyroidism Is Associated with Changes in Acylcarnitine Levels. *Thyroid*. 2017;27:1109–1117.
13. Handa AK, Fatima T, Mattoo AK. Polyamines: Bio-Molecules with Diverse Functions in Plant and Human Health and Disease. *Front Chem*. 2018;6:10.
14. Richman R, Park S, Akbar M, Yu S, Burke G. Regulation of thyroid ornithine decarboxylase (ODC) by thyrotropin. I. The rat. *Endocrinology*. 1975;96:1403–12.
15. Zusman DR, Burrow GN. Thyroid-stimulating hormone regulation of ornithine decarboxylase activity in the thyroid. *Endocrinology*. 1975;97:1089–95.
16. Matsuzaki S. [A potential role of polyamines in goiter formation (author's translation)]. *Nihon Naibunpi Gakkai Zasshi*. 1981;57:1554-66.
17. Ma HT, Reuse S, Koibuchi N, Matsuzaki S. Acute inhibitory effect of excess iodide on ornithine decarboxylase in the thyroid of propylthiouracil-treated rats. *J Endocrinol*. 1996;150:369–76.
18. Lee NK, MacLean HE. Polyamines, androgens, and skeletal muscle hypertrophy. *J Cell Physiol*. 2011;226:1453–60.
19. Ishii I, Ikeguchi Y, Mano H, Wada M, Pegg AE, Shirahata A. Polyamine metabolism is involved in adipogenesis of 3T3-L1 cells. *Amino Acids*. 2012;42:619–26.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Cette étude a mis en évidence une modification significative de huit métabolites entre les orbitopathies actives de Basedow et les inactives. Deux acylcarnitines ont une concentration augmentée dans les larmes des orbitopathies actives de Basedow, ce qui avait déjà été démontré au niveau plasmatique (37).

La concentration de spermine est augmentée dans les larmes des orbitopathies actives de Basedow. La spermine est issue de l'ornithine via l'activité de l'ornithine décarboxylase (ODC) qui est une enzyme stimulée par la TSH. Il est donc probable que la stimulation des fibroblastes orbitaires via les anticorps anti-récepteurs de la TSH augmente ainsi l'activité de l'ODC et donc la concentration en spermine. Par conséquent la concentration d'ornithine, le substrat principal, est parallèlement diminuée.

La concentration de citrulline est diminuée dans les larmes des orbitopathies actives de Basedow. La citrulline est aussi issue de l'ornithine via l'activité de l'ornithine carbamoyltransférase. Cette activité enzymatique est probablement relativement diminuée par l'hyperactivité de l'ODC entraînant une production préférentielle de spermine et une diminution de la citrulline.

Les concentrations de glycine, d'histidine et de sérine étaient augmentées dans les larmes des orbitopathies actives de Basedow sans que nous ne retrouvions d'explication dans la littérature ni de cause physiologique.

L'activité de l'ODC est représentée par le rapport putrescine/ornithine car l'ornithine est le substrat initial se transformant en putrescine puis en spermine via l'activité de l'ODC. Ce rapport était retrouvé significativement augmenté de 3,75 fois dans les larmes des orbitopathies actives de Basedow en comparaison aux orbitopathies inactives. La significativité et la spécificité de ce biomarqueur ont pu être confirmées

en comparant ce rapport à celui d'un groupe contrôle composé de patients atteints de sécheresse oculaire de toutes étiologies confondues.

La découverte de cette augmentation du rapport putrescine/ornithine et donc de l'activité de l'ODC pourrait être utile au diagnostic d'orbitopathie active de Basedow. L'activité inflammatoire de l'orbitopathie de Basedow est à ce jour jugée selon le *Clinical Activity Score* qui reste en partie subjectif, la cotation de l'hyperhémie conjonctivale ou de la rougeur palpébrale peut être différente par exemple selon les examinateurs. Ainsi ce rapport métabolomique objectif et facilement dosable pourrait s'avérer très utile dans des formes d'orbitopathie où il y a un doute sur leur activité clinique avec des scores limites entre 2 et 3.

Une étude secondaire comparant les profils métabolomiques des larmes de patients atteints d'orbitopathie de Basedow avec des larmes de patients atteints d'autres dysthyroïdies pourrait aussi apporter de la spécificité à ce biomarqueur. De même une comparaison serait possible avec les autres orbitopathies inflammatoires non dysthyroïdiennes, cela pourrait être d'une aide diagnostique devant une présentation clinique aigüe d'orbitopathie inflammatoire d'étiologie indéterminée.

Du fait du caractère non invasif du prélèvement de larmes via les bandelettes de Schirmer, nous pourrions envisager de réaliser des prélèvements itératifs lors du suivi de l'orbitopathie de Basedow et ainsi prédire des récives inflammatoires.

La limite principale de cette étude est le faible nombre de participants avec un recrutement monocentrique. Cependant les modifications métabolomiques retrouvées ont majoritairement une explication physiopathologique et correspondent aux données de la littérature.

L'activité de l'ODC semble être une clé de la modification métabolomique des larmes des orbitopathies actives de Basedow, elle entraîne une augmentation de la concentration de la spermine qui a des propriétés prolifératives et interfère

probablement sur la myogenèse et l'adipogenèse se produisant au niveau orbitaire. La recherche d'inhibiteurs spécifiques de l'ODC pourrait donc faire l'objet d'une étude ultérieure comme nouvelle cible thérapeutique de l'orbitopathie de Basedow.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Ji DY, Park SH, Park SJ, Kim KH, Ku CR, Shin DY, et al. Comparative assessment of Graves' disease and main extrathyroidal manifestation, Graves' ophthalmopathy, by non-targeted metabolite profiling of blood and orbital tissue. *Sci Rep*. 2018 Jun 18;8(1):9262.
2. Kang J, Li Y, Zhao Z, Zhang H. Differentiation between thyroid-associated orbitopathy and Graves' disease by iTRAQ-based quantitative proteomic analysis. *FEBS Open Bio*. 2021 Jul;11(7):1930–40.
3. Kishazi E, Dor M, Eperon S, Oberic A, Hamedani M, Turck N. Thyroid-associated orbitopathy and tears: A proteomics study. *J Proteomics*. 2018 06;170:110–6.
4. Byeon SK, Park SH, Lee JC, Hwang S, Ku CR, Shin DY, et al. Lipidomic differentiation of Graves' ophthalmopathy in plasma and urine from Graves' disease patients. *Anal Bioanal Chem*. 2018 Nov;410(27):7121–33.
5. Aass C, Norheim I, Eriksen EF, Børnick EC, Thorsby PM, Pepaj M. Comparative proteomic analysis of tear fluid in Graves' disease with and without orbitopathy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016 Nov;85(5):805–12.
6. Urbanski G, Assad S, Chabrun F, Chao de la Barca JM, Blanchet O, Simard G, et al. Tear metabolomics highlights new potential biomarkers for differentiating between Sjögren's syndrome and other causes of dry eye. *Ocul Surf*. 2021 Jul 28;S1542-0124(21)00078-1.
7. Struja T, Eckart A, Kutz A, Huber A, Neyer P, Kraenzlin M, et al. Metabolomics for Prediction of Relapse in Graves' Disease: Observational Pilot Study. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:623.
8. Weetman AP. Graves' disease. *N Engl J Med*. 2000 Oct 26;343(17):1236–48.
9. Perros P, Hegedüs L, Bartalena L, Marcocci C, Kahaly GJ, Baldeschi L, et al. Graves' orbitopathy as a rare disease in Europe: a European Group on Graves' Orbitopathy (EUGOGO) position statement. *Orphanet J Rare Dis*. 2017 20;12(1):72.
10. Smith TJ. Potential role for bone marrow-derived fibrocytes in the orbital fibroblast heterogeneity associated with thyroid-associated ophthalmopathy. *Clin Exp Immunol*. 2010 Oct;162(1):24–31.
11. Lehmann GM, Feldon SE, Smith TJ, Phipps RP. Immune mechanisms in thyroid eye disease. *Thyroid*. 2008 Sep;18(9):959–65.
12. Smith TJ, Hegedüs L, Douglas RS. Role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) pathway in the pathogenesis of Graves' orbitopathy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012 Jun;26(3):291–302.
13. Wiersinga WM, Bartalena L. Epidemiology and prevention of Graves' ophthalmopathy. *Thyroid*. 2002 Oct;12(10):855–60.

14. Bartley GB, Fatourehchi V, Kadrmas EF, Jacobsen SJ, Ilstrup DM, Garrity JA, et al. Chronology of Graves' ophthalmopathy in an incidence cohort. *Am J Ophthalmol*. 1996 Apr;121(4):426–34.
15. Diana T, Ponto KA, Kahaly GJ. Thyrotropin receptor antibodies and Graves' orbitopathy. *J Endocrinol Invest*. 2021 Apr;44(4):703–12.
16. Diana T, Kahaly GJ. Thyroid Stimulating Hormone Receptor Antibodies in Thyroid Eye Disease-Methodology and Clinical Applications. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg*. 2018 Aug;34(4S Suppl 1):S13–9.
17. Corvilain B, Hamy A, Brunaud L, Borson-Chazot F, Orgiazzi J, Bensalem Hachmi L, et al. Treatment of adult Graves' disease. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2018 Dec;79(6):618–35.
18. Mourits MP, Prummel MF, Wiersinga WM, Koornneef L. Clinical activity score as a guide in the management of patients with Graves' ophthalmopathy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1997 Jul;47(1):9–14.
19. Peleg A. The eyelids in Thyroid Orbitopathy. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2010 Mar;7 Suppl 2:230–3.
20. Hirokawa T, Mimura M, Tonari M, Sato Y, Fujita Y, Matsuo J, et al. Compressive optic neuropathy (CON) in Graves' disease caused by hypertrophy of levator and superior rectus muscles: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2021 Apr 9;100(14):e25062.
21. Pfeilschifter J, Ziegler R. Smoking and endocrine ophthalmopathy: impact of smoking severity and current vs lifetime cigarette consumption. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1996 Oct;45(4):477–81.
22. Bartalena L, Marcocci C, Tanda ML, Manetti L, Dell'Unto E, Bartolomei MP, et al. Cigarette smoking and treatment outcomes in Graves ophthalmopathy. *Ann Intern Med*. 1998 Oct 15;129(8):632–5.
23. Marcocci C, Bruno-Bossio G, Manetti L, Tanda ML, Miccoli P, Iacconi P, et al. The course of Graves' ophthalmopathy is not influenced by near total thyroidectomy: a case-control study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1999 Oct;51(4):503–8.
24. Vaidya B, Wright A, Shuttleworth J, Donohoe M, Warren R, Brooke A, et al. Block & replace regime versus titration regime of antithyroid drugs for the treatment of Graves' disease: a retrospective observational study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014 Oct;81(4):610–3.
25. Bartalena L, Baldeschi L, Dickinson A, Eckstein A, Kendall-Taylor P, Marcocci C, et al. Consensus statement of the European Group on Graves' orbitopathy (EUGOGO) on management of GO. *Eur J Endocrinol*. 2008 Mar;158(3):273–85.
26. Marcocci C, Kahaly GJ, Krassas GE, Bartalena L, Prummel M, Stahl M, et al. Selenium and the course of mild Graves' orbitopathy. *N Engl J Med*. 2011 May 19;364(20):1920–31.
27. Bartalena L, Veronesi G, Krassas GE, Wiersinga WM, Marcocci C, Marinò M, et al. Does early response to intravenous glucocorticoids predict the final outcome in



- patients with moderate-to-severe and active Graves' orbitopathy? *J Endocrinol Invest.* 2017 May;40(5):547–53.
28. Marquez SD, Lum BL, McDougall IR, Katkuri S, Levin PS, MacManus M, et al. Long-term results of irradiation for patients with progressive Graves' ophthalmopathy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001 Nov 1;51(3):766–74.
  29. Buisset A, Gohier P, Leruez S, Muller J, Amati-Bonneau P, Lenaers G, et al. Metabolomic Profiling of Aqueous Humor in Glaucoma Points to Taurine and Spermine Deficiency: Findings from the Eye-D Study. *J Proteome Res.* 2019 Mar 1;18(3):1307–15.
  30. Chao de la Barca JM, Simard G, Amati-Bonneau P, Safiedeen Z, Prunier-Mirebeau D, Chupin S, et al. The metabolomic signature of Leber's hereditary optic neuropathy reveals endoplasmic reticulum stress. *Brain.* 2016 Nov 1;139(11):2864–76.
  31. Pisella PJ, Baudouin C, Hoang-Xuan T. Société Française d'Ophtalmologie Rapport 2015 Surface Oculaire.
  32. Chen L, Zhou L, Chan ECY, Neo J, Beuerman RW. Characterization of the human tear metabolome by LC-MS/MS. *J Proteome Res.* 2011 Oct 7;10(10):4876–82.
  33. Galbis-Estrada C, Martinez-Castillo S, Morales JM, Vivar-Llopis B, Monleón D, Díaz-Llopis M, et al. Differential effects of dry eye disorders on metabolomic profile by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biomed Res Int.* 2014;2014:542549.
  34. Galbis-Estrada C, Pinazo-Durán MD, Martínez-Castillo S, Morales JM, Monleón D, Zanon-Moreno V. A metabolomic approach to dry eye disorders. The role of oral supplements with antioxidants and omega 3 fatty acids. *Mol Vis.* 2015;21:555–67.
  35. Cicalini I, Rossi C, Pieragostino D, Agnifili L, Mastropasqua L, di Ioia M, et al. Integrated Lipidomics and Metabolomics Analysis of Tears in Multiple Sclerosis: An Insight into Diagnostic Potential of Lacrimal Fluid. *Int J Mol Sci.* 2019 Mar 13;20(6):E1265.
  36. Rossi C, Cicalini I, Cufaro MC, Agnifili L, Mastropasqua L, Lanuti P, et al. Multi-Omics Approach for Studying Tears in Treatment-Naïve Glaucoma Patients. *Int J Mol Sci.* 2019 Aug 18;20(16):E4029.
  37. Al-Majdoub M, Lantz M, Spéjel P. Treatment of Swedish Patients with Graves' Hyperthyroidism Is Associated with Changes in Acylcarnitine Levels. *Thyroid.* 2017 Sep;27(9):1109–17.

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Pathophysiological model suggested by the tear metabolic signature obtained in active versus inactive TAO. ....	27
--	----

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Table 1.</b> Demographic and clinical status of individuals with active and inactive thyroid-associated orbitopathy. ....	23
<b>Table 2.</b> List of metabolites with significant modification of concentrations in tears of patients with active compared to inactive orbitopathy. ....	24
<b>Table 3.</b> Demographic and clinical status of individuals with dry eye of undetermined origin .....	25

# TABLE DES MATIERES

RESUME .....	2
INTRODUCTION .....	3
ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES .....	5
A.    ÉPIDEMIOLOGIE .....	5
B.    PHYSIOPATHOLOGIE .....	5
C.    CLINIQUE .....	6
D.    TRAITEMENTS .....	9
E.    LE METABOLOME.....	13
F.    LE FILM LACRYMAL.....	13
G.    LIEN ENTRE METABOLOME ET LARMES. ....	14
ARTICLE .....	16
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	30
BIBLIOGRAPHIE.....	33
LISTE DES FIGURES .....	36
LISTE DES TABLEAUX.....	37
TABLE DES MATIERES.....	38



Un profil métabolomique dans les larmes montrant l'implication de la spermine dans l'orbitopathie de Basedow.

RÉSUMÉ

**Objectif :** Déterminer une signature métabolomique dans les larmes des patients atteints d'orbitopathie active de Basedow.

**Méthodes :** Comparaison de la composition métabolomique des larmes de patients présentant une orbitopathie active de Basedow (n=21) par rapport à ceux présentant une orbitopathie inactive (n=24). Analyse par spectrométrie de masse avec le kit Biocrates Absolute IDQ p180 mesurant 188 métabolites.

**Résultats :** Parmi les 44 métabolites mesurés, huit présentaient des concentrations significativement modifiées entre les deux groupes comparés. Deux acylcarnitines à chaîne courte (propionylcarnitine, butyrylcarnitine) et la spermine ont montré des concentrations accrues dans le groupe des orbitopathies actives de Basedow, tandis que l'ornithine, la glycine, la sérine, la citrulline et l'histidine étaient diminuées dans ce groupe. Le rapport putrescine/ornithine représentant de l'activité de l'ornithine décarboxylase était significativement augmenté dans le groupe des orbitopathies actives de Basedow en comparaison avec le groupe des orbitopathies inactives de Basedow ( $p=0,0011$ , augmentation d'activité de 3,75 fois), la spécificité de ce biomarqueur étant maintenue par rapport à un groupe témoin indépendant présentant une sécheresse oculaire non classifiée.

**Conclusion :** Cette signature métabolique suggère fortement un mécanisme physiopathologique impliquant la stimulation de l'ornithine décarboxylase par les auto-anticorps du récepteur de la TSH dans les fibroblastes orbitaires, conduisant à une augmentation de la synthèse de spermine. Les propriétés prolifératives de la spermine pourraient contribuer à l'augmentation de la myogenèse et de l'adipogenèse périorbitaire. Nos résultats suggèrent un circuit métabolique qui pourrait à la fois fournir une nouvelle cible thérapeutique et un biomarqueur pour l'orbitopathie de Basedow active.

**Mots-clés :** Orbitopathie de Basedow ; Métabolomique ; Ornithine décarboxylase ; Spermine ; Orbitopathie dysthyroïdienne.

A tear metabolomic profile showing an involvement of spermine in thyroid-associated orbitopathy.

ABSTRACT

**Purpose :** About half of patients with Graves' disease develop an orbitopathy related to an inflammatory expansion of periorbital adipose tissue and muscles.

**Methods :** We used a targeted metabolomics approach to compare the metabolic composition of tears in patients with active ( $n = 21$ ) *versus* inactive ( $n = 24$ ) thyroid-associated orbitopathy, using the Biocrates Absolute IDQ p180 kit to measure 188 metabolites by mass spectrometry.

**Results :** Among the 44 metabolites accurately measured, eight showed significant altered concentrations between the two compared groups. Two short-chain acylcarnitines (propionylcarnitine and butyrylcarnitine) and spermine showed relative increased concentrations in patients with active orbitopathy, whereas ornithine, glycine, serine, citrulline and histidine were relatively decreased in this group. In addition, the ratio putrescine/ornithine representing the activity of ornithine decarboxylase was significantly increased in patients with active orbitopathy when compared with patients with inactive orbitopathy ( $p = 0.0011$ , fold change 3.75); and the specificity of this biomarker was maintained when compared to a control group with unclassified dry eye.

**Conclusions :** This metabolic signature strongly suggests a pathophysiological mechanism involving the stimulation of ornithine decarboxylase by TSH receptor autoantibodies in orbital fibroblasts, leading to increase spermine synthesis. The proliferative properties of spermine may contribute to the periorbital increased myogenesis and adipogenesis that characterize thyroid-associated orbitopathy. Our results suggest a metabolic circuit that could both provide a new therapeutic target and a candidate biomarker for Graves' ophthalmopathy.

**Keywords :** Graves' ophthalmopathy ; Metabolomics ; Ornithine decarboxylase ; Spermine ; Thyroid associated orbitopathy.