



**HAL**  
open science

# Etude des mécanismes neuro-inflammatoires dans les voies visuelles sur un modèle murin d'hypertonie oculaire

Anaïs Sapienza

► **To cite this version:**

Anaïs Sapienza. Etude des mécanismes neuro-inflammatoires dans les voies visuelles sur un modèle murin d'hypertonie oculaire. Organes des sens. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066589 . tel-01334574

**HAL Id: tel-01334574**

**<https://theses.hal.science/tel-01334574v1>**

Submitted on 19 Jul 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité  
Physiopathologie

Ecole doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Présentée par

**Anaïs SAPIENZA**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de la thèse :

**Etude des mécanismes neuro-inflammatoires dans  
les voies visuelles sur un modèle murin  
d'hypertonie oculaire.**

Soutenue le 16 novembre 2015 devant le jury composé de :

Pr Michel PAQUES

Dr Jean-Louis NAHON

Pr Christophe CHIQUET

Dr Christophe COMBADIÈRE

Dr Florian SENNLAUB

Dr Stéphane MELIK PARSADANIANTZ

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

## **Etude des mécanismes neuro-inflammatoires dans les voies visuelles centrales dans un modèle murin d'hypertonie oculaire unilatérale.**

**Résumé :** La neuropathie optique glaucomateuse est une pathologie du système visuel conduisant à une cécité irréversible qui affectera 80 millions de personnes dans le monde en 2020. Cette pathologie se caractérise par la dégénérescence du trabéculum (filtre responsable du drainage de l'humeur aqueuse de la chambre antérieure de l'œil), ce qui engendre une augmentation de la pression intraoculaire (PIO). Cette hypertonie oculaire entraîne une neurodégénérescence rétinienne caractérisée par la perte progressive des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) et une atteinte de leurs axones qui forment le nerf optique. Les thérapies actuelles ciblent principalement l'abaissement de la PIO ; cependant, il a été observé que l'atteinte du champ visuel des patients continue de s'accroître. L'hypothèse neuro-inflammatoire dans le glaucome est de plus en plus envisagée du fait de la réponse précoce de la réaction gliale dans la rétine. En outre, de nombreuses données suggèrent que l'inflammation, induite par la pathologie glaucomateuse, ne survient pas seulement au niveau de la rétine mais s'étend aussi aux voies visuelles postérieures ainsi qu'à l'œil controlatéral.

L'objectif de cette thèse a été d'étudier, par des approches de biologie cellulaire et moléculaire, les mécanismes neuro-inflammatoires affectant la rétine et les structures visuelles postérieures lors du glaucome. Dans ce but, nous avons utilisé un modèle préclinique d'hypertonie oculaire unilatérale chez le rat, obtenu après cautérisation des veines épisclérales de l'œil droit. Ainsi, nous avons mis en évidence la présence d'une atteinte des CGR de l'œil droit cautérisé, corrélé à une astrogliose et une microglie (activation/infiltration de macrophages) dans les rétines et dans les colliculi supérieurs de l'œil droit cautérisé et aussi controlatéral. Nous avons montré une expression significativement plus élevée de marqueurs pro-inflammatoires dans la rétine de l'œil droit cautérisé (IL-1 $\beta$  et CCL2) et dans le colliculus supérieur gauche controlatéral (IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$ ). De plus, nous observons une surexpression de la connexine 43 dans les deux colliculi supérieurs, qui est une protéine de jonction communicante portée par les cellules endothéliales et astrocytaires.

Dans ce modèle d'hypertension oculaire unilatérale de l'œil droit, nous avons aussi observé la présence d'une activité inflammatoire dans la rétine controlatérale à la lésion, se propageant au colliculus droit. En effet, les CGR de la rétine gauche non lésée font synapses majoritairement dans le colliculus droit. En partant de ce postulat, nous avons émis l'hypothèse que la neuro-inflammation se propagerait d'un côté à l'autre des colliculi par un mécanisme de communication cellulaire. Afin d'étayer notre hypothèse, nous avons développé un modèle de neuropathie optique au moyen d'injection stéréotaxique unilatérale de TNF $\alpha$  dans le colliculus supérieur droit. Le but de cette étude était de déterminer si une lésion unilatérale du colliculus droit pouvait générer des défauts visuels et inflammatoires bilatéraux. Ainsi, nous avons observé que l'injection unilatérale de TNF $\alpha$  dans le colliculus droit engendrait une réactivité microgliale et un état neuro-inflammatoire se propageant aux deux colliculi. En outre, nous avons pu établir chez les animaux ayant reçu le TNF $\alpha$ , l'existence d'une atteinte visuelle bilatérale corrélée à une microglie et une astroglie dans les rétines gauches et droites.

Ces résultats révèlent dans la pathologie glaucomateuse l'existence d'une composante inflammatoire retrouvée dans toutes les structures visuelles. Les colliculi supérieurs semblent être le siège d'une communication cellulaire forte et le lieu des échanges intercellulaires menant à l'atteinte controlatérale dans la pathologie glaucomateuse.

# Liste des publications

---

**Anaïs Sapienza**, Anne-Laure Raveu, Elodie Reboussin, Christophe Roubeix, Céline Boucher, Julie Degardin, Christophe Baudouin and Stéphane Melik Parsadaniantz (2015) Bilateral neuro-inflammatory processes in visual pathways induced by unilateral ocular hypertension in the rat, being submitted to Journal of Neuroinflammation.

Roubeix, C., Godefroy, D., Mias, C., **Sapienza, A.**, Riancho, L., Degardin, J., Fradot, V., Ivkovic, I., Picaud, S., Sennlaub, F., Denoyer, A., Rostene, W., Sahel, J.A., Parsadaniantz, S.M., Brignole-Baudouin, F., Baudouin, C., 2015. Intraocular pressure reduction and neuroprotection conferred by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an animal model of glaucoma. *Stem Cell Res. Ther.* 6, 177. doi:10.1186/s13287-015-0168-0

Denoyer, A, Roubeix, C., **Sapienza, A**, Réaux-Le Goazigo, A, Mélik-Parsadaniantz, S., & Baudouin, C. (2015). [Retinal and trabecular degeneration in glaucoma: New insights into pathogenesis and treatment]. *J Fr Ophtalmol*, 38(4), 347–356. doi:10.1016/j.jfo.2014.11.004

Van Steenwinckel, J., Auvynet, C., **Sapienza, A.**, Reaux-Le Goazigo, A., Combadière, C., & Melik Parsadaniantz, S. (2014). Stromal cell-derived CCL2 drives neuropathic pain states through myeloid cell infiltration in injured nerve. *Brain, Behavior, and Immunity*. doi:10.1016/j.bbi.2014.10.016

**Sapienza, A.**, Réaux-Le Goazigo, A., Rostène, W., & Mélik-Parsadaniantz, S. (2014). [Chemokines and attraction of myeloid cells in peripheral neuropathic pain]. *Biologie Aujourd'hui*, 208(1), 31–44. doi:10.1051/jbio/20140011



# Table des matières

---

<b>Table des illustrations</b>	<b>4</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>2</b>
<b>Chapitre 1 : Revue bibliographique</b>	<b>2</b>
<b>I Anatomie et fonction des voies visuelles chez l'homme</b>	<b>3</b>
I-1 Organisation antéro-postérieure de l'oeil	3
I-1-1 Le segment antérieur	4
I-1-2 Le segment postérieur	5
I-2 La rétine neurale	6
I-2-1 Les cellules ganglionnaires	7
I-2-2 Les cellules gliales	8
I-2-2-1 Les astrocytes	8
I-2-2-2 Les cellules gliales de Müller	9
I-2-2-3 Les cellules microgliales	10
I-3 Statut immunitaire de l'œil	14
I-3-1 Les barrières hémato-oculaires	14
I-3-2 Mécanismes du privilège immun	15
I-4 Du nerf optique au cerveau	15
I-4-1 Description du nerf optique, de ses structures et du chiasma optique	15
I-5 Les différentes voies visuelles postérieures	18
I-5-1 La voie rétino-géniculo-corticale	18
I-5-2 La voie rétino-colliculaire ou rétinotectale	19
I-5-3 La voie rétinohypothalamique	21
I-6 Comparaison anatomique du système visuel entre l'homme et le rongeur	21
I-6-1 Œil et composition rétinienne	21
I-6-2 Champ visuel et voies de projection	22
<b>II La neuropathie optique glaucomateuse</b>	<b>24</b>
II-1 Différents types de glaucome	24
II-1-1 Glaucomes congénitaux	25
II-1-2 Glaucomes secondaires à angle ouvert	25
II-1-3 Glaucomes à angle fermé	25

II-1-4 Glaucomes à pression normale _____	26
II-2 Présentation clinico-pathologique du GPAO _____	26
II-2-1 Epidémiologie du GPAO _____	26
II-2-2 Facteurs de risque du GPAO _____	27
II-2-3 Physiopathologie du GPAO _____	27
II-2-4 Signes cliniques du GPAO _____	28
II-3 Pathogénie de l'altération des cellules ganglionnaires _____	30
II-3-1 Implication du facteur pressionnel dans la compression biomécanique _____	30
II-3-2 Implication des facteurs non pressionnels dans la dégénérescence des CGR _____	31
II-3-2-1 Facteurs neurotrophiques _____	31
II-3-2-2 Excitotoxicité du glutamate _____	32
II-3-2-3 Stress oxydant _____	33
II-3-2-4 Activation des cellules gliales _____	34
II-4 Modèles animaux de glaucome _____	34
II-4-1 Modèle génétique DBA/2J _____	35
II-4-2 Photocoagulation trabéculaire _____	36
II-4-3 Obstruction trabéculaire par microbilles _____	36
II-4-4 Injection épisclérale de solution salée hypertonique _____	37
II-4-5 Cautérisation des veines épisclérales _____	37

### **III Le glaucome, une neuropathie optique neurodégénérative**

#### **inflammatoire \_\_\_\_\_ 39**

III-1 Réactivité gliale et infiltration des cellules immunitaires dans les modèles expérimentaux de glaucome _____	39
III-1-1 Activation de la macroglie _____	39
III-1-2 Activation microgliale _____	41
III-1-3 Migration transendothéliale des monocytes _____	43
III-2 Voies de signalisation pro-inflammatoires dans le glaucome _____	43
III-2-1 Voie des récepteurs de type Toll _____	43
III-2-2 Voie du TNF $\alpha$ _____	44
III-3 Le glaucome est-il une pathologie neuro-dégénérative ? _____	45
III-3-1 Neuro-imagerie des anomalies cérébrales de patients glaucomateux _____	46
III-3-2 Etude neuropathologique de la dégénérescence neuronale dans les voies visuelles _____	47

#### **Objectifs généraux \_\_\_\_\_ 49**

#### **Chapitre 2 : Résultats expérimentaux \_\_\_\_\_ 51**

<b>Publication : Bilateral neuro-inflammatory processes in visual pathways induced by unilateral ocular hypertension in the rat</b>	<b>52</b>
<b>I Présentation de l'article</b>	<b>53</b>
<b>II Article</b>	<b>56</b>
<b>Chapitre 3 : Discussion et perspectives</b>	<b>89</b>
1- Similarités de notre modèle d'étude avec l'homme	91
2- Infiltration et caractérisation des cellules immunes	92
3- Activation de la voie p38	94
4- Signalisation du TNF $\alpha$	95
5- Le TNF $\alpha$ et la barrière hémato encéphalique	96
6- Le TNF $\alpha$ et les produits thérapeutiques	97
7- Choix de l'utilisation du TNF $\alpha$ pour notre modèle d'inflammation du Colliculus	98
8- L'inflammation induite dans le colliculus supérieur est-elle suffisante à induire une inflammation dans les deux yeux ?	98
<b>Références bibliographiques</b>	<b>103</b>



# Table des illustrations

---

**Figure 1** : Anatomie de l'œil humain.

**Figure 2** : Circulation de l'humeur aqueuse.

**Figure 3** : Organisation structurale rétinienne (A). Section histologique d'une rétine humaine. Coloration hématoxyline/éosine (B).

**Figure 4** : Cellules gliales de Müller de rat.

**Figure 5** : Localisation et morphologie des microglies rétiniennes.

**Figure 6** : Mécanismes des phases de quiescence et d'activation des microglies.

**Figure 7** : Organisation rétinotopique des axones des CGR.

**Figure 8** : Rendu plastique d'une lame criblée créée grâce à une imprimante 3D StrataSys.

**Figure 9** : Devenir des fibres rétiniennes.

**Figure 10** : Schéma du colliculus supérieur présentant son organisation laminaire ainsi que ses différentes afférences.

**Figure 11** : Voies visuelles antérieures et postérieures chez le rat.

**Figure 12** : Comparaison d'une papille normale et glaucomateuse.

**Figure 13** : Représentation schématique de la tête d'un nerf optique normal (panel du haut) et glaucomateux (panel du bas).

**Figure 14** : Photographies reproduisant l'évolution d'un déficit du champ visuel par atteinte glaucomateuse.

**Figure 15** : Œil de rat Sprague-Dawley.

**Figure 16** : Marquage immunohistochimique de la GFAP (marron) d'une rétine normale (A) et de patient glaucomateux (B) contre coloré à l'hématoxyline éosine.

**Figure 17** : Images IRM d'une section coronale d'un cerveau d'un homme sain à gauche et d'un patient glaucomateux bilatéral à droite.

**Figure 18** : Sections de CGL colorées au Nissl de sujet sain (à gauche) et de patient glaucomateux (à droite).

**Figure 19** : Représentation schématique de la voie rétino-colliculaire chez le rat et des processus inflammatoires retrouvés lors d'une hypertension oculaire unilatérale.

# Liste des abréviations

---

$\alpha$ -MSH : alpha-melanocyte stimulating hormone	HTO : Hypertonie oculaire
ADAM-17 : A Disintegrin And Metalloproteinase 17	Iba1 : Ionized calcium binding adaptor molecule 1
AP-1 : Activator protein 1	IFN- $\gamma$ : Interféron gamma
ARNm : ARN messenger	IL-n : Interleukine n
BDNF : Brain-derived neurotrophic factor	IRM : Imagerie par résonance magnétique
BHE : Barrière hémato encéphalique	JNK : c-jun N-terminal kinase
BHR : Barrière hémato-rétinienne	LC : Lame criblée
CGL : Corps genouillé latéral	LCR : Liquide céphalorachidien
CGR : Cellules ganglionnaires rétinienne	LIF : Leukemia inhibitory factor
CCG : Couche des cellules ganglionnaires	LPS : Lipopolysaccharide
CM : Cellule de Müller	MAPK : Mitogen-activated protein kinases
CNE : Couche nucléaire externe	NF-kB : Nuclear factor-kappa B
CNI : Couche nucléaire interne	NGF : Nerve growth factor
CNTF : Ciliary neurotrophic factor	NGL : Noyau géniculé latéral
CPE : Couche plexiforme externe	NMDA : N-methyl-D-aspartate
CPI : Couche plexiforme interne	NOS : Oxyde nitrique synthase
CS : Colliculus supérieur	NT-3 : Neurotrophin-3
EGFP+ : Enhanced green fluorescent protein–positive	NT-4/5 : Neurotrophine 4/5
En : Stade embryonnaire n	p75 <sup>NTR</sup> : p75 neurotrophin receptor
EMP : Précurseurs érythro-myéloïdes	PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns
EPR : Epithélium pigmentaire rétinien	PIO : Pression intra-oculaire
ERK : Extracellular signal-regulated kinase	ROS : Espèces réactives de l'oxygène
GDNF : Glial cell line-derived neurotrophic factor	SNC : Système nerveux central
GFAP : Glial fibrillary acidic protein	TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor beta
GLAST : Glutamate–Aspartate Transporter	TLR : Toll like receptor
GPAO : Glaucomes primitifs à angle ouvert	TNF $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha
Gpmb : Glycosylated protein mb	TNFR1 : Tumor necrosis factor receptor 1
HA : Humeur aqueuse	Trk : Tropomyosin related kinase
HRP : Horseradish peroxidase	Tyrp1 : Tyrosinase-related protein 1
	VIP : Vasoactive Intestinal Peptide

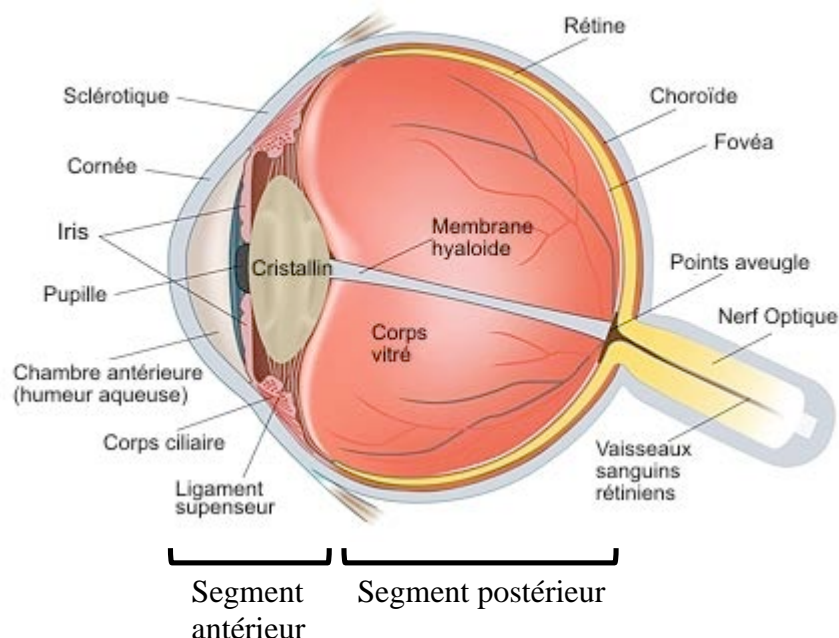
# *Chapitre 1 : Revue bibliographique*

---

# I Anatomie et fonction des voies visuelles chez l'homme

## I-1 Organisation antéro-postérieure de l'oeil

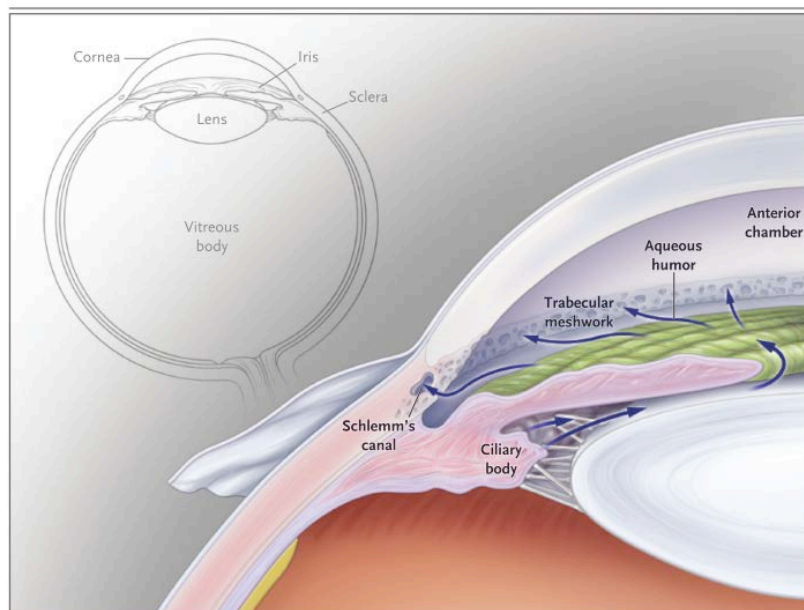
L'œil est un organe sensoriel complexe assurant la capture et le traitement des informations lumineuses permettant à l'individu d'interagir de façon privilégiée avec l'environnement. De par son origine embryonnaire, l'œil fait partie du système nerveux central (SNC). Son rôle consiste à recevoir et à traiter l'information visuelle (images, textures, couleurs, position et mouvement) puis à la transmettre au cortex visuel par l'intermédiaire du nerf optique. L'œil est formé de trois enveloppes concentriques : la tunique fibreuse externe, composée de la sclérotique qui devient la cornée en avant ; la tunique uvéale, composée par l'iris, les corps ciliaires et la choroïde ; et la rétine, qui tapisse tout le fond de l'œil. L'œil humain est classiquement divisé en deux parties : le segment antérieur et le segment postérieur séparés par le cristallin (Figure 1).



**Figure 1 : Anatomie de l'œil humain.** Schéma en coupe sagittale présentant les différentes structures de l'œil (Adapté d'après <http://focuseyecalgary.com>).

## I-1-1 Le segment antérieur

Il est limité en avant par la cornée et en arrière par le cristallin et est rempli d'un liquide appelé l'humeur aqueuse. L'humeur aqueuse est un liquide nourricier vis-à-vis de la cornée et est sécrété de façon permanente par les procès ciliaires (glandes situées derrière l'iris) puis éliminé au niveau de l'angle iridocornéen. Ce liquide est composé essentiellement de plus de 99% d'eau, de vitamine C, d'acide lactique, de glucose et d'une faible concentration en protéines (De Berardinis et al., 1965). Normalement, l'humeur aqueuse s'écoule au travers d'un filtre appelé trabéculum qui tapisse l'angle iridocornéen sur la totalité de sa circonférence pour être réabsorbé dans la circulation sanguine *via* les veines épisclérales (Figure 2). Si ce filtre est altéré et que l'hydraulique de ce liquide n'est plus régulée, la pression intraoculaire augmente, provoquant alors une pathologie, le glaucome.



**Figure 2 : Circulation de l'humeur aqueuse.** L'humeur aqueuse est sécrétée par les corps ciliaires et circule à travers la pupille dans la chambre antérieure. Elle passe ensuite à travers le trabéculum dans le canal de Schlemm jusqu'au système veineux épiscléral où elle est éliminée (Adapté d'après (Kwon et al., 2009).

La cornée est la première lentille transparente de l'œil dont elle recouvre la partie antérieure de l'œil devant l'iris et la pupille. La cornée est majoritairement constituée de fibres collagènes entrelacées recouvertes d'un feuillet appelé épithélium. Sa fonction est essentielle et permet la transmission et la réflexion de la lumière. Contrairement à la plupart des tissus du corps, la cornée doit garder sa transparence, elle ne contient donc aucun

vaisseau sanguin pour se nourrir ou se prémunir des infections. Au lieu de cela, elle puise son oxygène dans les larmes et ses nutriments dans l'humeur aqueuse. La cornée est le tissu le plus innervé du corps (300 à 500 fois plus que la peau) (Mutter et al., 1997). Cette innervation sensitive douloureuse est responsable du réflexe cornéopalpebral.

Entre la cornée et le cristallin se trouve l'iris, diaphragme circulaire perforé en son centre par la pupille par laquelle traversent les rayons lumineux. La face antérieure de l'iris est formée d'un tissu conjonctif formant le stroma irien. L'abondance de mélanocytes (cellules synthétisant la mélanine) dans ce stroma définit la couleur de l'iris. La taille de la pupille est contrôlée par les muscles dilatateurs et constricteurs (sphincter) de l'iris. Sa taille est fonction de la luminosité extérieure : plus la luminosité est importante plus la pupille sera petite. Ainsi la quantité de lumière reçue par les cellules photoréceptrices est partiellement régulée.

Le cristallin forme la limite entre les deux segments, c'est une lentille transparente biconvexe. Il est maintenu par les ligaments suspenseurs qui le relient aux muscles ciliaires (Figure 2). Il a pour rôle de concentrer les rayons lumineux au fond de l'œil directement sur les cellules photoréceptrices. Afin d'adapter l'œil au passage de la vision de loin à la vision de près, les muscles ciliaires sont capables de changer la courbure du cristallin, c'est l'accommodation. Le cristallin perd de son efficacité avec l'âge et devient moins élastique. Cette évolution naturelle de la vue s'appelle la presbytie. Le cristallin peut également s'opacifier conduisant à la cataracte, ce qui constitue la première cause de cécité dans le monde (Javitt et al., 1996).

## I-1-2 Le segment postérieur

Il est délimité en avant par la face arrière du cristallin et en arrière par la rétine neurale et l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) qui tapisse le fond de l'œil. Entre ces deux organes se trouve la cavité vitrénne remplie d'un gel transparent le vitré constitué à 95 % d'eau, de glycosaminoglycanes (acide hyaluronique) et de collagène qui lui confère sa viscoélasticité (Grus et al., 2007). Ce gel est contenu dans une enveloppe transparente qui adhère solidement à la rétine, la membrane hyaloïde. Les fonctions du vitré sont de maintenir la rétine sur la face postérieure de l'œil, de soutenir l'élasticité du globe oculaire et d'absorber les chocs subis par l'œil tout en permettant de laisser passer la lumière grâce à sa transparence.

L'EPR (ou rétine pigmentaire) est formé par un épithélium simple fait d'une monocouche de cellules synthétisant de la mélanine. Leur noyau est situé au pôle basal de la cellule, les grains pigmentés au pôle apical. La face apicale de ces cellules présente des expansions

qui enveloppent les segments externes des photorécepteurs afin de permettre leur phagocytose (événement physiologique qui permet le recyclage des photopigments et le renouvellement des segments externes). La face basale repose sur la membrane de Bruch qui réunit la choroïde à la rétine. L'EPR possède de multiples fonctions qui le rendent indispensable au maintien de l'intégrité de la rétine et à sa nutrition. En effet, il participe à l'élimination des déchets de la couche nucléaire externe (CNE) et permet le transfert des nutriments et de l'oxygène de la choroïde vers la CNE. La choroïde est une couche tissulaire collée à la membrane de Bruch qui est une source de nutriments et d'oxygène pour la rétine externe. La sclère est une membrane conjonctive la plus externe de l'œil qui a pour fonction de le protéger et de maintenir sa forme.

Les corps ciliaires bordent l'avant de la chambre postérieure autour du cristallin. Ils sont constitués de faisceaux musculaires lisses entrecroisés formant les muscles ciliaires permettant à l'œil de faire converger les rayons lumineux. Ils sont aussi composés des procès ciliaires, situés sur la face postérieure des corps ciliaires. Ce sont de petits replis possédant de minuscules vaisseaux qui contribuent à la synthèse de l'humeur aqueuse.

## I-2 La rétine neurale

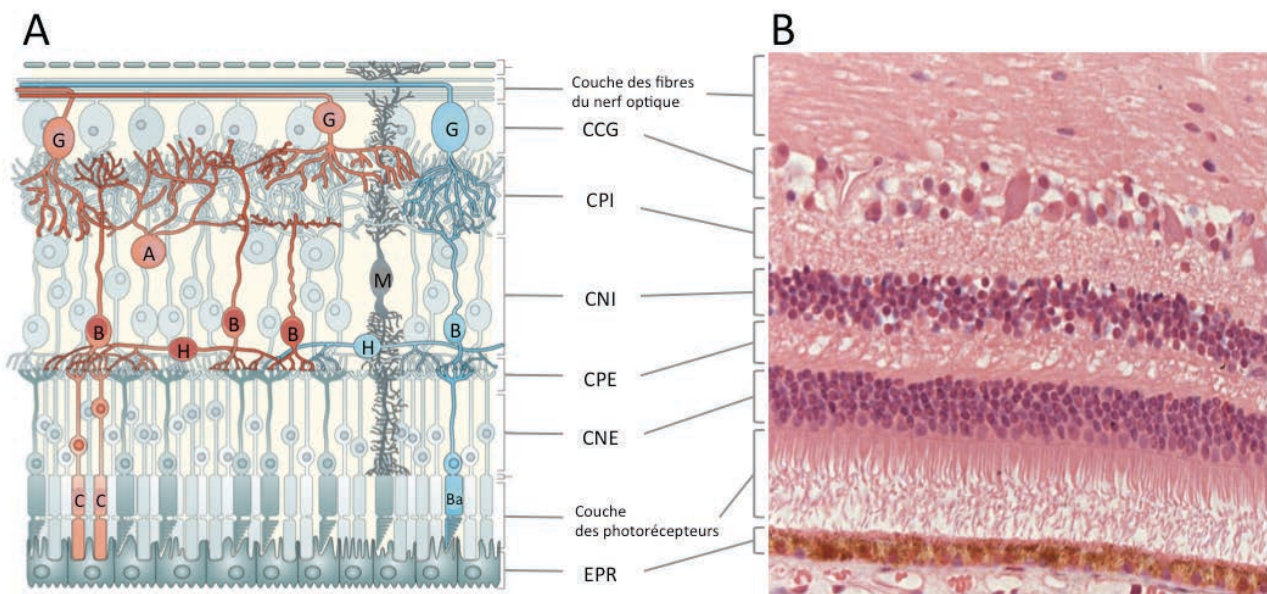
La rétine neurale est le siège de la réception du signal lumineux et de sa transformation en influx nerveux. Anatomiquement elle tapisse le fond de l'œil, accolée à l'EPR et à la choroïde dans sa partie la plus externe et à *l'ora serrata* (jonction entre la rétine et les corps ciliaires) dans sa partie périphérique puis en son centre par la tête du nerf optique.

La rétine neurale des vertébrés est organisée en la succession de trois couches neuronales de l'EPR jusqu'au vitré (Figure 3). Après la concentration des rayons lumineux sur le fond de l'œil, la lumière est absorbée par les segments externes des photorécepteurs et convertie en signal électrique. Le signal nerveux va être transmis ensuite aux corps cellulaires des photorécepteurs (cônes et bâtonnets) présents dans la couche nucléaire externe (CNE) puis à tous les neurones intermédiaires de la couche nucléaire interne (CNI). Cette couche comprend les noyaux des cellules bipolaires, horizontales, amacrines et des cellules gliales de Müller. L'information visuelle est acheminée dans la couche des cellules ganglionnaires (CCG) dont les axones forment le nerf optique qui la transmet ensuite au cerveau (thalamus, mésencéphale et cortex visuel). Deux couches de connexions synaptiques et de fibres sont aussi visibles dans la rétine, la couche plexiforme externe (CPE) située entre la CNE et la CNI et la couche plexiforme interne (CPI) située entre la CNI et la CCG. Ces couches acellulaires contiennent des capillaires sanguins irriguant la rétine interne.

Comme pour tout tissu nerveux, plusieurs types de cellules gliales sont présents au sein de la rétine. Nous retrouvons la cellule gliale de Müller déjà citée, les astrocytes dans la CCG et les microglies dans la CCG et dans les deux couches plexiformes.

Il existe deux types de photorécepteurs dans la rétine, les cônes et les bâtonnets qui se distinguent par la forme de leurs segments externes (coniques pour les cônes et cylindriques pour les bâtonnets).

Dans cette partie introductive, je m'attacherai à développer plus en détails le rôle et les fonctions des cellules ganglionnaires et des cellules gliales de la rétine.



**Figure 3 : Organisation structurale rétinienne (A). Section histologique d'une rétine humaine. Coloration hématoxyline/éosine (B).** G=cellule ganglionnaire ;A=cellule amacrine ;B=cellule bipolaire ;H=cellule horizontale ;M=cellule gliale de Müller ;C=cône ;Ba=bâtonnets ; CCG=Couche des cellules ganglionnaires ;CNE=Couche nucléaire externe ;CNI=Couche nucléaire interne ;CPE=Couche plexiforme externe ;CPI=Couche plexiforme interne ;EPR=Epithélium pigmentaire rétinien (Adapté d'après (Swaroop et al., 2010) et www.intechopen.com).

### I-2-1 Les cellules ganglionnaires

Les cellules ganglionnaires rétinienne (CGR) sont le dernier rempart dans la transmission verticale de l'influx nerveux provenant des photorécepteurs. Les corps cellulaires des cellules ganglionnaires projettent leurs dendrites dans la CPI où elles forment des synapses avec les cellules amacrines et bipolaires. L'information visuelle est ensuite distribuée au



cerveau via leurs fins (0,5-1 mm) et longs (environ 50 mm) axones (Yu et al., 2013). Les axones des CGR convergent vers un point de la rétine situé au pôle postérieur de l'œil appelé la papille optique, c'est l'endroit où se forme le nerf optique. Le nerf optique est composé de plus d'un million d'axones de CGR (Bruesch and Arey, 1942) conduisant l'information visuelle de la rétine au cerveau et passant par le chiasma optique, les tractus optiques et faisant synapses sur le corps géniculé latéral et médial, le colliculus supérieur (CS) et le noyau prétectal (Hein, K., Bähr, 2010).

## I-2-2 Les cellules gliales

En plus de ses neurones, la rétine neurale contient trois types de cellules gliales : les cellules de Müller, les astrocytes et les cellules microgliales. Les cellules de Müller et les astrocytes (cellules macrogliales) participent au maintien de l'homéostasie de la rétine tandis que les cellules microgliales sont les cellules du système immunitaire résident de la rétine.

### I-2-2-1 Les astrocytes

La présence des astrocytes dans la rétine est restreinte à la couche des fibres des RGC et au niveau de la tête du nerf optique. La morphologie caractéristique des astrocytes est due à leur corps cellulaire aplati et à la présence de nombreux processus fibreux rayonnants d'où leur dénomination de cellules étoilées. Le filament intermédiaire majoritaire des astrocytes est la GFAP (Glial fibrillary acidic protein). Les cellules astrocytaires peuvent donc être révélées aisément par des techniques d'immunohistochimie avec un anticorps contre la GFAP. La morphologie des astrocytes change selon leur localisation dans la rétine. En périphérie, les astrocytes adoptent plutôt une forme stellaire symétrique alors que, au niveau de la tête du nerf optique, ils ont une forme beaucoup plus allongée du fait de leur présence sur plusieurs couches parallèles (Triviño et al., 1996).

Les astrocytes supportent plusieurs fonctions essentielles et nécessaires au bon fonctionnement rétinien. En effet, lors du développement, ils forment une matrice cellulaire utilisée comme support à la formation du réseau vasculaire rétinien (Fruttiger, 2007). Ils participent également à la mise en place de la barrière hématorétinienne interne. En effet, le recouvrement des vaisseaux rétinien par les prolongements des astrocytes limite les échanges entre le sang et la rétine (Rungger-Brandle and Leuenberger, 2008). Les astrocytes jouent également un rôle actif dans le métabolisme neuronal. Par leurs contacts

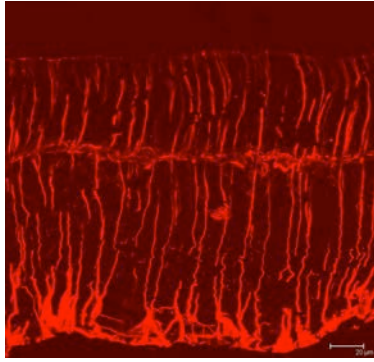
au niveau des régions synaptiques, ils agissent sur la dispersion et la recapture des neurotransmetteurs, participant ainsi à la modulation du signal au cours de la vision.

Au cours d'une lésion du SNC, les astrocytes peuvent devenir réactifs. Le marqueur le plus évident de cette activation est la surexpression de la GFAP et d'autres filaments intermédiaires comme la vimentine et la nestine. En effet, le réseau de filaments intermédiaires devient proéminent dans les processus fibreux et les corps cellulaires des astrocytes (Pekny and Nilsson, 2005).

#### I-2-2-2 Les cellules gliales de Müller

Les cellules de Müller (CM) sont les principales cellules macrogliales de la rétine des vertébrés représentant 90% de la glie rétinienne (Vecino et al., 2015). Ce sont des cellules spécialisées qui s'étendent de façon radiale à travers toute la rétine, de l'espace vitréen à l'espace sous-rétinien (Figure 4). Les corps cellulaires des CM sont situés dans la CNI (Figure 3) et projettent de façon irrégulière des prolongements fins et épais en direction des membranes limitantes internes et externes. Ces membranes sont constituées des extrémités des CM qui forment un lien anatomique et fonctionnel entre les compartiments vasculaires et les neurones rétiniens entre lesquels s'effectuent des échanges moléculaires d'ions, d'eau, de nutriments ou de déchets (Reichenbach et Bringmann, 2013). Les CM assurent plusieurs fonctions vitales au sein de la rétine. En effet, elles garantissent le maintien de la structure rétinienne de par leur morphologie ; elles contribuent à l'homéostasie ionique et au maintien du pH dans la rétine, ainsi qu'à la régulation du flux sanguin et à la maintenance de la BHE (Bringmann et al., 2006). Elles sont impliquées dans le métabolisme glucidique des neurones en leur fournissant les nutriments nécessaires tels que le lactate et le pyruvate et en éliminant les produits de dégradation. Enfin, elles participent à la régulation des neurotransmetteurs, en particulier le glutamate, au niveau des synapses grâce à leur recapture et à leur recyclage.

Tout comme les astrocytes classiques, la gliose des CM se caractérise principalement par la surexpression de la GFAP. Un élément important est aussi observé lors de lésions rétiniennes, à savoir l'activation de la voie ERK (extracellular signal-regulated kinase) au niveau de la CM (Bringmann et al., 2006).



**Figure 4 : Cellules gliales de Müller de rat** (D'après <http://www.retinalmicroscopy.com>).

### I-2-2-3 Les cellules microgliales

Les cellules microgliales constituent 10 à 20% des cellules gliales du SNC (Fu et al., 2014). Elles constituent la population résidente de phagocytes mononucléés du système nerveux appartenant au système glial qui supporte et protège les fonctions neuronales. Parmi leurs fonctions, deux paraissent essentielles : la défense immunitaire et la surveillance du SNC. Elles jouent le rôle de sentinelle en détectant les premiers signes d'une lésion dans ces tissus immunologiquement privilégiés que sont le cerveau et la rétine (cf. partie I-3).

#### Origine des microglies

L'origine exacte des microglies a longtemps été source de débat dans la littérature. Trois hypothèses avaient été proposées par la communauté scientifique : le neuro-ectoderme (développement du SNC, comme pour les astrocytes, les oligodendrocytes et les neurones), les monocytes/macrophages de la circulation sanguine ou le mésoderme (Li et al., 2015). Cependant, ces dernières années, l'origine des microglies semble enfin faire consensus. En effet, plusieurs groupes mettent en évidence que les cellules microgliales (et tous les macrophages tissulaires comprenant aussi les cellules épidermiques de Langherans et les cellules de Küpffer du foie) dériveraient des précurseurs érythromyéloïdes (EMP) primitifs, détectés dans le sac vitellin au stade embryonnaire E8 (Kierdorf et al., 2013) (Perdiguero et al., 2015) et envahiraient le cerveau pendant le développement fœtal. Une deuxième vague d'invasion microgliale est observée lors des premiers jours après la naissance.

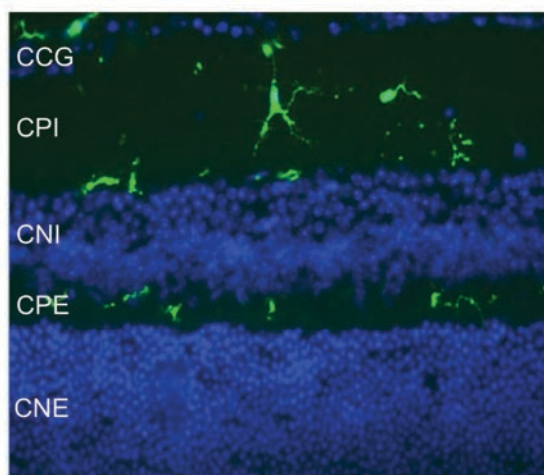
#### Renouvellement des microglies dans la rétine

Des expériences *in vivo* d'injection de BrdU (agent s'incorporant dans l'ADN nouvellement synthétisé des cellules en prolifération) chez une souris normale montrent que très peu de

cellules sont positives pour le BrdU et le CD11b (marqueur des phagocytes mononucléés) dans la rétine (Xu et al., 2007). La prolifération des microglies au sein de la rétine est donc très limitée en conditions physiologiques. Le renouvellement du pool microglial se ferait grâce aux cellules myéloïdes venant de la circulation sanguine. Cependant, une équipe a montré que, grâce à des souris irradiées puis transplantées avec des cellules de la moelle osseuse EGFP+ (enhanced green fluorescent protein-positive), il y avait une invasion minime de cellules myéloïdes (Kaneko et al., 2008). En effet, en l'absence de lésion rétinienne spécifique, les cellules de la moelle osseuse ne traverseraient pas la BHR, mais cela reste tout de même nature à débat dans la littérature.

### Homéostasie microgliale

Les microglies ont dans la rétine adulte une distribution pluristratifiée et résident dans la CCG et dans les CPI et CPE (Figure 5). A l'état physiologique ou « quiescent », les cellules microgliales sont caractérisées par un corps cellulaire fin possédant de nombreuses ramifications. Cette configuration spatiale et morphologique leur permet d'analyser l'environnement tissulaire et de fournir une surveillance globale de la rétine (Karlstetter et al., 2014) et d'épurer la rétine des débris métaboliques et cellulaires (Nimmerjahn et al., 2005). Afin de percevoir les changements environnementaux, les microglies expriment des facteurs neuroprotecteurs et anti-inflammatoires. De plus, elles expriment des récepteurs pour différents ligands jouant un rôle majeur dans la défense immunitaire et la régulation immune comme des récepteurs du complément, des immunoglobulines, des cytokines, des chimiokines et autres (Langmann, 2007). Un mécanisme majeur pour la régulation de l'homéostasie microgliale est l'interaction directe avec les autres cellules de la rétine. Le récepteur chimiokinique CX3CR1 est exprimé de façon constitutive par les microglies. L'unique ligand associé, CX3CL1 (Fractalkine), qui est exprimé par les neurones, va lier son récepteur afin de réguler l'homéostasie et empêcher la neurotoxicité (Figure 6) (Cardona et al., 2006). Ce signal neuronal va indiquer aux microglies de demeurer dans un état quiescent (Combadière et al., 2007) (Benarroch, 2013). Un autre signal majeur qui va restreindre l'activation microgliale, c'est l'interaction entre le CD200 exprimé par les microglies et le CD200R exprimé par les neurones. En effet, cette interaction va déclencher une diminution de l'expression de médiateurs pro-inflammatoires et une régulation positive des mécanismes anti-inflammatoires (González et al., 2014).



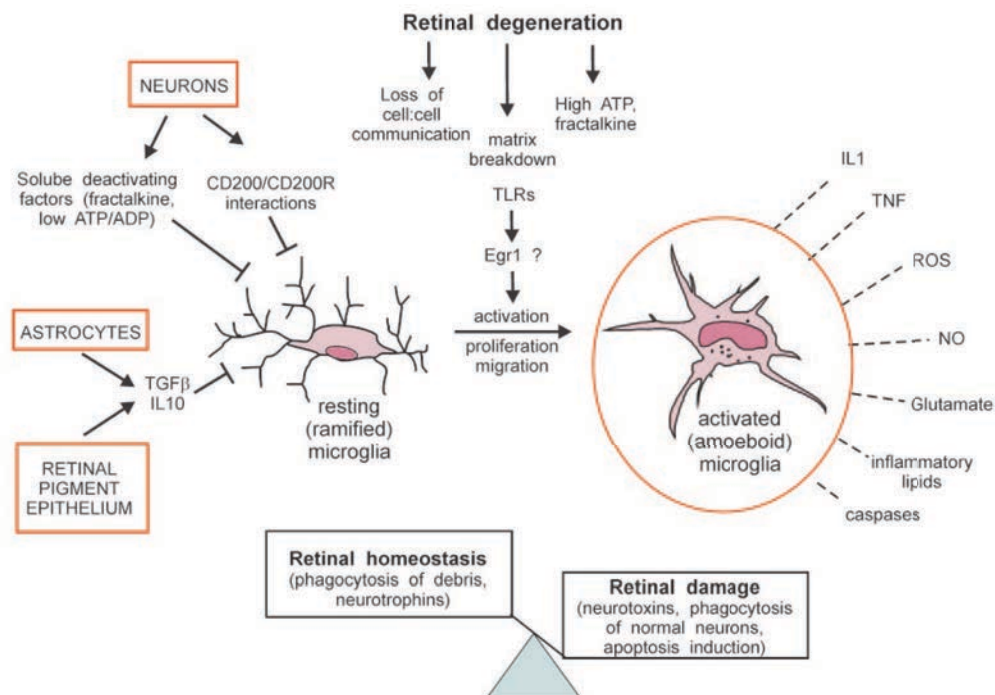
**Figure 5 : Localisation et morphologie des microglies rétiniennes.**  
 CCG=Couche des cellules ganglionnaires ; CNE=Couche nucléaire externe ; CNI=Couche nucléaire interne ; CPE=Couche plexiforme externe ; CPI=Couche plexiforme interne (Adapté d'après (Karlstetter et al., 2010).

La rétine a besoin de maintenir un niveau physiologique de facteurs neurotrophiques et cela peut se faire grâce à la communication intercellulaire entre les microglies et les cellules de Müller (CM). Les microglies peuvent déclencher la libération par les CM de facteurs tels que le GDNF, le NGF, le LIF et le NT3 qui vont promouvoir la survie des photorécepteurs lors de conditions pathologiques (Wang and Wong, 2014) (Karlstetter et al., 2014). Les microglies peuvent donc induire directement une réponse adaptative des CM sans impliquer les marqueurs classiques de gliose réactionnelle. Le RPE semble lui aussi jouer un rôle dans le maintien de l'homéostasie rétinienne. En effet, il est capable de sécréter du TGF $\beta$  qui stimulerait un phénotype anti-inflammatoire pour les microglies (Paglinawan et al., 2003).

#### Processus d'activation microgliale

Des modifications pathologiques comme une infection, une ischémie ou une lésion tissulaire peuvent mener à une modification rapide des propriétés des microglies, de leur forme et de leur expression génique définie comme l'« activation microgliale ». La réponse microgliale se traduit par des changements morphologiques comme la rétraction des prolongements les plus fins et l'augmentation de la taille du soma ; les microglies prennent alors une apparence amiboïde (Karlstetter et al., 2014). Les microglies activées deviennent mobiles et migrent vers le site de lésion grâce à l'ATP libéré par le tissu environnant (neurones et astrocytes) (Davalos et al., 2005). Elles montrent aussi une prolifération, une phagocytose excessive et une production de différents facteurs pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , des ROS,

du glutamate...(Figure 6) (Langmann, 2007). Tous ces changements sont accompagnés de l'expression de marqueurs de surface spécifiques incluant le F4/80, CD68, CD11b (ou complément receptor 3). Il est important de noter qu'il n'existe pas deux stades de polarisation des microglies mais bien plusieurs niveaux d'activation microgliale permettant d'adapter la réponse au contexte pathologique (pour revue voir Franco et Fernández-Suárez, 2015).



**Figure 6 : Mécanismes des phases de quiescence et d'activation des microglies.** Les microglies ramifiées sont gardées dans un état quiescent pour réguler l'homéostasie rétinienne grâce aux contacts cellulaires et aux facteurs libérés par les neurones, les astrocytes et le RPE. Plusieurs éléments peuvent déclencher la dégénérescence rétinienne et mener à l'activation, la prolifération et à la migration microgliale. Les microglies activées sécrètent différents facteurs bioactifs menant à une réponse exagérée des microglies puis à une lésion rétinienne (d'après (Langmann, 2007).

## I-3 Statut immunitaire de l'œil

### I-3-1 Les barrières hémato-oculaires

L'œil est en interface permanente avec l'environnement mais est peu vulnérable du fait de ses multiples moyens de défense. En effet, l'œil est considéré comme un site de privilège immun où des mécanismes cellulaires et moléculaires sont mis en place afin de limiter la réponse immunitaire et préserver la vision (Perez et al., 2013). La cornée, barrière optiquement favorable, constitue un sanctuaire immunitaire grâce à l'absence de vascularisation sanguine et lymphatique. Les parties internes de l'œil bénéficient aussi d'un privilège immunitaire du fait du réseau vasculaire présent dans la rétine. En effet, la rétine est formée par deux barrières distinctes : la barrière hémato-rétinienne (BHR) interne constituée par les cellules endothéliales des vaisseaux rétinien et la BHR externe constituée par les cellules de l'EPR qui séparent les vaisseaux choroïdiens fenestrés de la rétine externe (Rungger-Brandle and Leuenberger, 2008). Ces barrières assurent l'homéostasie ionique et immunologique rétinienne en régulant les échanges dans les deux sens et la protection du tissu, très vulnérable de par sa quasi-impossibilité à se régénérer (Streilein, 2003).

La BHR interne est formée par un réseau de jonctions serrées des cellules endothéliales des vaisseaux intrarétiniens, des péricytes présents autour des capillaires rétinien et est renforcée par les extensions cytoplasmiques des astrocytes et des cellules de Müller. Les péricytes confèrent un apport structural à l'endothélium et participent au maintien de la paroi capillaire (Shepro and Morel, 1993). L'endothélium des capillaires rétinien, comme celui des capillaires du cerveau, n'a pas d'enveloppe conjonctive mais est au contact de prolongements de cellules gliales. Outre son rôle structural, la macroglie sécrète des facteurs humoraux qui vont influencer l'étanchéité de la barrière (Wolburg et Lippoldt, 2002).

La BHR externe est, elle, composée de trois couches : l'endothélium fenestré de la choriocapillaire, la membrane de Bruch et l'EPR. Les cellules de l'EPR sont dotées de jonctions serrées intercellulaires et ont un rôle immunosuppresseur (Perez et al., 2013). La membrane de Bruch, exempte de cellules, est dotée d'une haute résistance à la rupture du fait de sa composition en élastine et en collagène (Booij et al., 2010). Elle régule les échanges entre la rétine et le système vasculaire choroïdien des nutriments, de l'oxygène et des produits de déchets métaboliques.

### I-3-2 Mécanismes du privilège immunitaire

La régulation immunitaire au sein de l'œil est effective sous la forme de processus actifs tels que la présence d'un environnement immunosuppresseur, la participation du système Fas-FasL et des mécanismes suppresseurs mis en place par l'EPR (Stein-Streilein, 2008).

Les cellules de l'EPR forment la première ligne de défense contre les cellules inflammatoires provenant du sang et peuvent réguler leur activation. Elles possèdent des propriétés similaires aux macrophages comme l'activité phagocytaire, la capacité à présenter les antigènes et la sécrétion de cytokines pro- ou anti-inflammatoires. Les cellules de l'EPR expriment des molécules de la mort programmée comme FasL et sont capables d'altérer la fonction et d'induire l'apoptose des cellules infiltrantes exprimant Fas sans inflammation ni lésion tissulaire (Griffith et al., 1995) (Stein-Streilein, 2013).

Tout comme l'humeur aqueuse, le vitré possède une fonction immunosuppressive (pour l'immunité innée et adaptative) de par les molécules le composant, en particulier les neuropeptides. En effet, il contient une quantité importante de TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) qui régule la prolifération, la différenciation et la survie des lymphocytes. Il contient aussi l' $\alpha$ -MSH (alpha-melanocyte stimulating hormone) qui joue un rôle important dans la modulation de l'homéostasie immunitaire, qui favorise la production de TGF- $\beta$  et diminue l'expression de l'IFN- $\gamma$  (Interféron gamma) (Taylor, 2009). Le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide), un autre neuropeptide à action anti-inflammatoire, régule l'inflammation par son influence sur les macrophages en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires comme TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor alpha), IL-1 (Interleukine-1), IL-6, IL-12 et IFN- $\gamma$ , et en stimulant la production de cytokines anti-inflammatoires comme IL-10, IL-1R antagoniste et TGF- $\beta$  (Stein-Streilein, 2013).

## I-4 Du nerf optique au cerveau

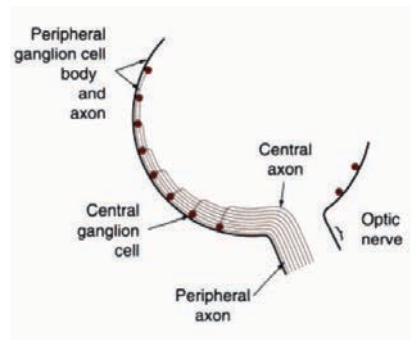
### I-4-1 Description du nerf optique, de ses structures et du chiasma optique

Le nerf optique, formé par la convergence d'environ 1 million d'axones des cellules ganglionnaires (Bruesch et Arey, 1942), débute anatomiquement au niveau de la papille optique, sa longueur totale, du globe oculaire au chiasma optique, étant de 5 à 6 cm. Le nerf



optique est composé de quatre portions : intraoculaire, intraorbitaire, intracanaulaire et intracrânienne.

Lorsque les axones entrent dans la tête du nerf optique, ils maintiennent leur organisation rétinienne (rétinotopie). Les fibres issues de la rétine périphérique entrent dans la partie périphérique du nerf optique et celles issues de la rétine centrale entrent dans la partie centrale (Figure 7).



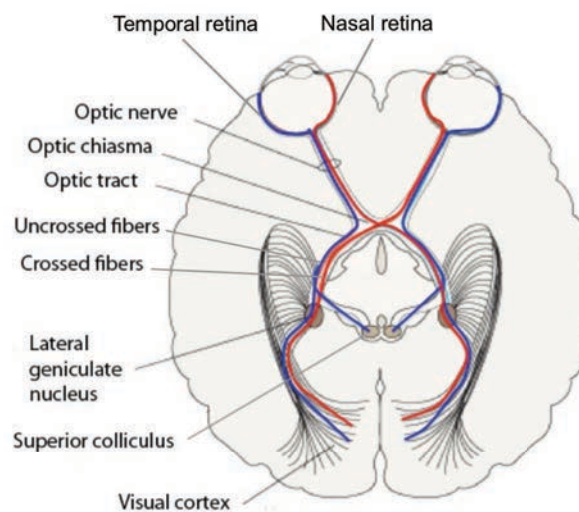
**Figure 7 : Organisation rétinotopique des axones des CGR** (D'après Atlas of Glaucoma, Neil T. Choplin, Diane C. Lundy 1998).

Avant leur sortie du globe oculaire, les fibres optiques traversent la sclère au niveau de la lame criblée (LC) qui comporte environ 500 à 600 pores (Figure 8) (Marek et al., 2014). La LC est composée d'une structure tridimensionnelle faite de faisceaux flexibles du tissu conjonctif qui sont composés principalement de laminine, d'élastine et de collagènes (Nickells et al., 2012). La partie interne de la LC est en relation étroite avec le réseau astrocytaire prélaminaire qui va individualiser chaque axone non myélinisé du tissu conjonctif. La LC forme une barrière physique entre l'espace intraoculaire et l'espace rétrobulbaire de l'orbite afin de stabiliser la pression intraoculaire (Jonas et al., 2003). En effet, il existe un gradient de pression au niveau de la LC entre l'espace intraoculaire qui présente une pression élevée et l'espace rétrobulbaire contenant le liquide céphalorachidien (LCR) qui présente une pression basse. La LC a la capacité de résister à la pression sans se déformer grâce à son épaisseur, à la rigidité de la matrice extracellulaire et à la tension sclérale. Cette capacité est essentielle dans la protection des structures qui la traversent, à savoir les axones des CGR, l'artère et la veine centrale rétinienne.



**Figure 8 : Rendu plastique d'une lame criblée créée grâce à une imprimante 3D StrataSys** (D'après <http://www.bcr.org/content/eyes-have-it-biomechanical-models-explore-disorders-eye>).

Après le passage de la lame criblée, les axones des cellules ganglionnaires acquièrent une gaine de myéline oligodendrogliale et s'entourent de gaines méningées (pie-mère, arachnoïde et dure-mère) (Prasad and Galetta, 2011). Cette disposition anatomique permet la libre circulation du LCR autour du nerf optique jusqu'à la papille. Les nerfs optiques quittent le crâne par le canal optique ce qui constitue la portion intracanaulaire du nerf optique. C'est un canal osseux auquel le nerf optique adhère par l'intermédiaire de sa gaine méningée. Le nerf optique rejoint ensuite le crâne dans sa partie intracrânienne, où il est uniquement entouré par gaine pie-mérienne, avant d'atteindre le chiasma optique. Le chiasma optique est la partie du cerveau où les deux nerfs optiques se croisent. L'entrecroisement chiasmatique sert à rassembler les informations provenant des moitiés de chaque rétine qui voient la même partie du champ visuel. Les fibres des nerfs optiques se rejoignent au niveau du chiasma optique où, chez un sujet normal, environ 50% des fibres issues de chaque œil se retrouvent décussés et les autres 50% restant du côté ipsolatéral (Kupfer and Downer, 1967) (Prasad and Galetta, 2011). Plus précisément, les fibres issues des zones temporales de la rétine sont directes (en bleu sur la Figure 9) alors que celles issues des zones nasales (en rouge sur la Figure 9) se retrouvent du côté controlatéral. Les relations spatiales que les cellules ganglionnaires entretiennent entre elles au sein de la rétine sont préservées au niveau de leurs cibles centrales. Les structures visuelles centrales présentent donc une représentation ordonnée de l'espace visuel. La partie de l'espace visuel que voit chaque œil constitue son champ visuel. En vision binoculaire, un point fixé dans le champ visuel se projette sur les deux fovéas de sorte que les champs visuels des deux yeux se recouvrent en grande partie. L'hémichamp binoculaire gauche comprend donc le champ visuel nasal de l'œil droit et le champ visuel temporal de l'œil gauche.



**Figure 9 : Devenir des fibres rétiniennes**  
(Adapté de [http://www.afd-ld.org/~fdp\\_neuro/2-5-contenu-b.php](http://www.afd-ld.org/~fdp_neuro/2-5-contenu-b.php)).

## I-5 Les différentes voies visuelles postérieures

Au delà du chiasma optique, les axones des CGR forment le tractus optique (ou bandelette optique) qui contient des fibres provenant des deux yeux. Ces axones pourront atteindre trois cibles dans le cerveau :

- le corps genouillé latéral (CGL) du thalamus, puis les radiations optiques et le cortex visuel primaire : c'est la voie rétino-géniculo-corticale (voie visuelle principale), responsable de la majeure partie de la perception visuelle consciente.
- le colliculus, dans le mésencéphale, qui coordonne les mouvements de la tête et des yeux, et le pretectum, qui stabilise l'image, formant la voie rétinocolliculaire ou rétinotectale.
- le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus, formant la voie rétino-hypothalamique.

### I-5-1 La voie rétino-géniculo-corticale

La voie rétino-géniculo-corticale est la voie principale de la perception visuelle consciente. En effet, chez le primate, 80 à 90% des fibres des CGR projettent dans le CGL, le premier relais synaptique situé dans le thalamus (Gupta et Yücel, 2007). Une organisation rétinotopique est conservée dans le CGL. En effet, le CGL est composé de six couches neuronales qui reçoivent des projections des deux yeux, et chacune de ces couches ne reçoit l'information que d'un seul œil. Les axones des CGR de l'œil ipsilatéral (rétine temporale en bleu sur la Figure 9) font synapse dans les couches 2, 3 et 5, tandis que les axones des CGR de l'œil controlatéral (rétine nasale en rouge sur la Figure 9) font synapse dans les couches 1, 4 et 6 (le Gros Clark, 1941).

Le CGL permet la transmission de trois canaux visuels majeurs *via* différentes voies :

- La voie magnocellulaire (M) (détection et analyse du mouvement) concerne des neurones à gros corps cellulaire localisés dans les couches les plus inférieures 1 et 2. Leurs afférences proviennent d'un sous-ensemble de cellules rétiniennes appelées cellules ganglionnaires M ou parasol. Ces cellules sont très peu sensibles aux contrastes de couleurs et se situent plutôt autour du centre et en périphérie de la rétine. Les neurones relais des couches magnocellulaires du CGL empruntent les radiations optiques pour se connecter spécifiquement dans la couche 4C $\alpha$  du cortex visuel primaire et vont participer à la voie visuelle corticale dorsale pour l'analyse du mouvement, du contraste et des rapports dans l'espace.

- La voie parvocellulaire (P) (analyse de la forme, des couleurs, de la profondeur et des détails), qui concerne des neurones à plus petit corps cellulaire des couches les plus supérieures 3, 4, 5 et 6, reçoivent leurs afférences de cellules ganglionnaires P ou naines. Ces cellules sont les plus nombreuses, sont chacune connectée à peu de cellules de la rétine (champ récepteur étroit donc acuité maximale), et sont sensibles au caractère chromatique de la stimulation. Elles sont les plus fréquentes au centre de la rétine. Les neurones relais des couches parvocellulaires du CGL empruntent les radiations optiques pour se connecter spécifiquement dans la couche 4C $\beta$  du cortex visuel primaire (V1). Le canal parvocellulaire participe principalement à la voie visuelle corticale ventrale utilisée dans la reconnaissance des formes et des couleurs (Livingstone et Hubel, 1988). Il est impliqué dans l'acuité visuelle fine et la perception des textures d'objets, et participe aussi à la vision colorée du fait de l'opposition rouge/vert du champ récepteur des CGR naines.

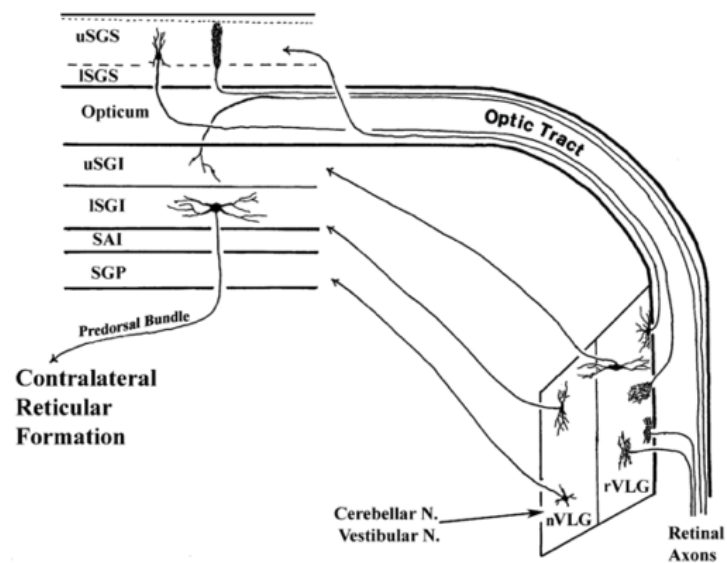
Chacune de ces voies présente en plus une sous-couche de corps cellulaires très petits, la sous-couche koniocellulaire (K) (analyse des couleurs et de l'espace). Il a été montré une bifurcation axonale des cellules ganglionnaires gamma assurant une double projection sur le CGL et le SC. Les neurones relais des couches koniocellulaires empruntent les radiations optiques pour se connecter spécifiquement dans les couches 2 et 3, et dans les blobs du cortex visuel primaire où ils participent à la vision colorée dans la voie corticale ventrale.

## I-5-2 La voie rétino-colliculaire ou rétino-tectale

La voie rétino-colliculaire participe aux mouvements rapides des yeux (saccades) et de la tête dans le but de changer la direction du regard vers une nouvelle cible visuelle (Gandhi et Katnani, 2011). Dix pour cent des CGR projettent dans le colliculus supérieur (CS), ce qui en fait la deuxième cible principale des CGR chez les primates (Perry et Cowey, 1984). Les deux CS sont situés dans le mésencéphale où ils forment la région du tectum avec les deux colliculus inférieurs qui reçoivent les afférences auditives. Les CS sont reliés anatomiquement aux CGL par les bras conjonctivaux supérieurs (faisceaux de fibres). Après la décussation des fibres au niveau du chiasma, les axones des CGR quittent les tractus optiques avant les CGL et empruntent les bras conjonctivaux supérieurs pour atteindre les CS.

Les CS sont classiquement structurés en sept couches cellulaires qui peuvent être regroupées en trois groupes : les couches superficielles, intermédiaires et profondes (Gandhi et Katnani, 2011). La couche la plus superficielle est appelée couche zonale du CS

(stratum zonale – SZ) située directement sous la pie-mère. Chez les mammifères, cette couche est extrêmement fine et acellulaire. Juste en dessous se situe la couche grise superficielle (stratum griseum superficiale - SGS) et peut être subdivisée en deux couches, la lame supérieure et inférieure (uSGS et ISGS respectivement) (Figure 10). En dessous se trouve la couche optique (stratum opticum - SO) dominée par les fibres, en particulier celles venant de la rétine. Ces deux couches forment la couche superficielle du CS recevant que des informations visuelles où se fait les connections synaptiques des CGR selon une organisation rétinotopique (May, 2006). Sous les couches superficielles se trouvent les couches intermédiaires composées de deux couches : la couche grise intermédiaire (stratum griseum intermediale - SGI) et la couche blanche intermédiaire (stratum album intermediale - SAI). La couche SGI peut être subdivisée en deux couches : la couche supérieure (uSGI) contenant moins de corps cellulaires que la couche inférieure (ISGI) du fait de la présence plus élevée de fibres. La couche la plus profonde du CS est appelée la couche grise profonde (stratum griseum profundum - SGP).



**Figure 10 : Schéma du colliculus supérieur présentant son organisation laminaire ainsi que ses différentes afférences.** uSGS=upper stratum griseum superficiale ; ISGS=lower stratum griseum superficiale ; uSGI=upper stratum griseum intermediale ; ISGI=lower stratum griseum intermediale ; SAI=stratum album intermediale ; SGP=stratum griseum profundum ; nVLG=portion non rétinienne du noyau genouillé ventral latéral ; rVLG=portion rétinienne du noyau genouillé ventral latéral (D'après May, 2006).

De façon fonctionnelle, les couches intermédiaires et profondes reçoivent des informations de différentes modalités sensorielles : visuelles, principalement via les couches superficielles, mais aussi auditives et somatotopiques. Elles contiennent également des

neurones impliqués dans la génération de saccades oculaires qui projettent dans les noyaux du tronc cérébral impliqué dans le contrôle des mouvements oculaires. Le CS serait impliqué dans la transformation de données sensorielles, en particulier visuelles, en données motrices pour guider le regard mais aussi la tête, le corps et les gestes de préhension.

### I-5-3 La voie rétinothalamique

La voie rétinothalamique correspond aux projections de certaines CGR riches en pigments photosensibles (mélanopsine) dans le noyau suprachiasmatique (Hattar et al., 2002). Ce noyau est une structure de l'hypothalamus située immédiatement au-dessus du chiasma optique. Cette voie est le support de la régulation des rythmes biologiques et de leur synchronisation avec l'alternance jour-nuit. L'information visuelle transmise au noyau suprachiasmatique est une information de luminance globale de la scène visuelle.

Les neurones des noyaux suprachiasmatiques projettent sur les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus pour rejoindre l'épiphyse (glande pinéale) qui sécrète la mélatonine.

## I-6 Comparaison anatomique du système visuel entre l'homme et le rongeur

### I-6-1 Œil et composition rétinienne

L'anatomie d'un œil humain n'est guère différente de celle de l'œil murin à l'exception de la taille du cristallin. En effet, chez l'homme, le cristallin est une lentille biconvexe et le vitré occupe environ 80 % du volume total de l'œil. Au contraire, chez le rongeur, le cristallin ressemble à une bille et occupe la majeure partie de la cavité vitréenne.

La rétine du rongeur est très similaire structurellement parlant à celle des humains. La principale différence réside sur le fait que les rongeurs ne possèdent ni de macula ni de fovéa. En outre, les cônes sont répartis sur toute la rétine, et non pas regroupés en une fovéa comme chez l'homme, ce qui a pour effet de réduire considérablement l'acuité visuelle du rongeur.

Chez l'homme, la densité des CGR varie de la zone centrale à la périphérie. Au niveau de la fovéa, un cône est relié individuellement à une CGR, il y a donc un nombre beaucoup plus

important de CGR dans cette région. Cette organisation permet de fournir un nombre d'informations visuelles fines plus élevées au cerveau et d'améliorer la résolution de l'image. Au contraire, le rongeur ne possédant pas de fovéa, le nombre de CGR est uniforme sur toute la rétine et ne forme qu'une seule couche.

## I-6-2 Champ visuel et voies de projection

Les yeux des rongeurs sont positionnés de façon latérale par rapport à leur tête. Il en résulte une vision panoramique avec une zone binoculaire étroite centrale entourée de deux régions monoculaires. La zone de vision binoculaire chez le rongeur ne couvre que 50 degrés alors que, chez l'homme, elle est de 135 degrés (Priebe et McGee, 2014).

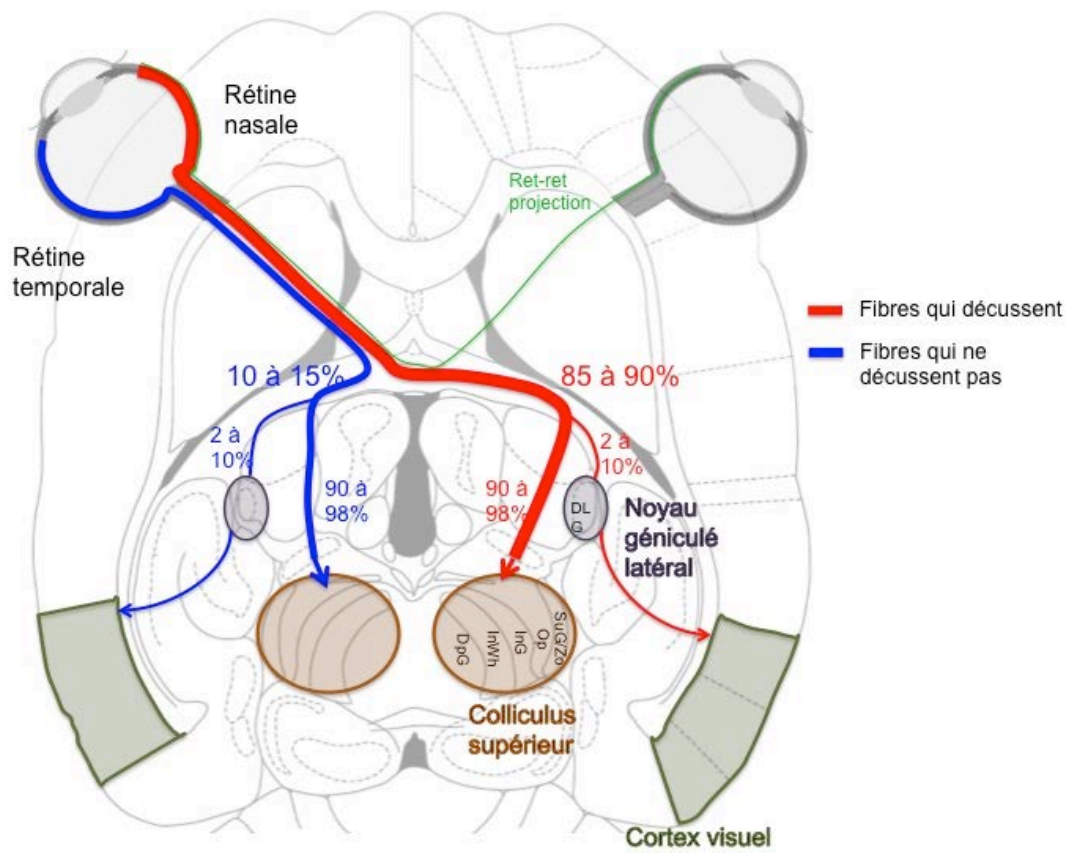
Le champ visuel de l'œil gauche se projette sur la rétine nasale et correspond aux fibres des CGR qui vont se retrouver décussées. Chez l'homme, nous avons vu que 50 % des fibres du nerf optique se retrouvent décussées. Chez le rongeur, une différence majeure apparaît ici car, 85 à 90 % des fibres se retrouvent décussées et seulement 10 à 15 % restent du côté ipsilatéral (Levkovitch-Verbin, 2004) (Figure 11). La majorité des fibres qui se retrouvent décussées correspond donc au champ monoculaire de l'œil gauche et la partie qui reste du côté ipsilatéral correspond à une partie du champ binoculaire.

La cible majeure des CGR chez l'homme est le CGL. En effet, l'homme possède une vision très précise qui demande une analyse poussée des couleurs, des formes, des contrastes, *etc.* Au contraire, chez le rongeur la cible principale des CGR est le CS avec 90 à 98 % des fibres qui se projettent directement dans cette structure (Forrester, 1967) (Chiu et al., 2008) (Salinas-Navarro et al., 2009). Comme nous l'avons vu précédemment, le CS contribue à la coordination des mouvements des yeux et de la tête afin d'adapter rapidement le regard aux différents stimuli. Cette fonction paraît essentielle aux rongeurs en leur qualité de proie.

La voie de projection rétino-rétinienne.

Il a été mis en évidence, il y a maintenant plus de 30 ans, une voie de projection des CGR d'une rétine à l'autre. Bunt et Lund (1981) ont été les premiers à décrire la voie de projection rétino-rétinienne. Ils l'ont observée chez des rats fœtaux mais elle disparaissait pendant le développement. Ils ont injecté dans un œil la peroxydase de raifort (horseradish peroxidase - HRP) chez des embryons et des rats nouveau-nés et ils ont détecté des CGR marqués dans la rétine contralatérale. Un peu plus tard, un autre groupe a montré que cette voie pouvait persister chez certains rats adultes, mais en étant non fonctionnelle (Muller et Holländer, 1988). Cette voie reste cependant marginale car elle ne concerne qu'une minorité de CGR (Nadal-Nicolás et al., 2015).

**Figure 11 : Schématisation des voies visuelles antérieures et postérieures chez le rat.** D'après les données de (Levkovitch-Verbin, 2004), (Muller and Holländer, 1988), (Nadal-Nicolás et al., 2015), (Forrester, 1967) (Chiu et al., 2008) (Salinas-Navarro et al., 2009).





## II La neuropathie optique glaucomateuse

Le glaucome est une neuropathie optique progressive définie par une atteinte du nerf optique liée à une dégénérescence des CGR et menant à une atteinte du champ visuel pouvant aller jusqu'à la cécité. L'hypertonie oculaire (HTO) est le premier facteur de risque connu qui contribue dans la plupart des cas à la pathologie et demeure à ce jour le seul événement pathogénique accessible aux traitements médicaux ou chirurgicaux. La pathologie glaucomateuse est une maladie insidieuse car elle est asymptomatique au début de son évolution, ce qui complique sa détection. En effet, l'atteinte visuelle est d'abord périphérique puis centrale, et ce n'est que dans les formes tardives très sévères que le déficit visuel irréversible est ressenti par le patient (Baudouin et al., 2013).

Le glaucome est la deuxième cause de cécité dans le monde après la cataracte. Il a été projeté que le glaucome affectera 80 millions de personnes dans le monde d'ici 2020 (Quigley et Broman, 2006) et 112 millions de personnes en 2040 (Tham et al., 2014). Ces prévisions soulignent l'intérêt des recherches dans ce domaine à la fois pour le diagnostic mais aussi pour le traitement du glaucome.

### II-1 Différents types de glaucome

Il existe différents types de glaucome qui peuvent être classés en :

- Glaucomes congénitaux
- Glaucomes à angle ouvert :
  - Glaucomes primitifs à angle ouvert (GPAO) : le GPAO fait l'objet d'un chapitre en II.2.
  - Glaucomes secondaires à angle ouvert
- Glaucomes à angle fermé :
  - Glaucomes primitifs à angle fermé
  - Glaucomes secondaires à angle fermé
- Glaucomes à pression normale

### II-1-1 Glaucomes congénitaux

Les glaucomes congénitaux sont des formes rares de glaucome chez le jeune enfant, qui surviennent entre la naissance et les deux ans de l'enfant (*Terminology and guidelines for glaucoma*, 2014). Ils sont dus à une dysgénésie (croissance incomplète pendant la vie utérine) de l'angle iridocornéen, et en particulier du trabéculum, provoquant une diminution de l'écoulement de l'humeur aqueuse vers les vaisseaux collecteurs. Le glaucome congénital primitif touche 1 enfant sur 12 000 à 18 000 naissances parmi les caucasiens et est beaucoup plus fréquent en cas de consanguinité. La plupart de ces cas de glaucomes congénitaux sont sporadiques mais certains (10 à 40 %) auraient un mode de transmission autosomique récessif.

### II-1-2 Glaucomes secondaires à angle ouvert

Un glaucome est dit secondaire quand le facteur étiologique est connu. Il peut être lié à une pathologie oculaire déjà existante comme l'uvéite, le glaucome pigmentaire, le glaucome pseudo-exfoliatif, à un traumatisme ou à l'effet secondaire de certains médicaments comme les corticoïdes.

### II-1-3 Glaucomes à angle fermé

Le glaucome à angle fermé est lié à des poussées d'hypertonie oculaire engendrées par un accollement entre l'iris et le trabéculum dans l'angle iridocornéen. L'origine du glaucome à angle fermé est le plus souvent anatomique (glaucome primaire à angle fermé) mais il peut être également dû à la prise de certains médicaments (glaucome secondaire à angle fermé). La notion d'angle fermé est définie par un contact entre l'iris et le trabéculum qui entraîne son obstruction et donc un défaut de l'écoulement de l'humeur aqueuse et une augmentation de la pression intraoculaire (PIO). Un des mécanismes majeurs de la fermeture de l'angle est le blocage pupillaire, c'est-à-dire un blocage du passage pupillaire de l'humeur aqueuse suite à un accollement entre l'iris et le cristallin.

La prévalence de ce glaucome varie selon la race, le sexe et la région d'origine. En effet, cette forme prédomine dans les populations de l'Est asiatique (1,4 %) (Foster et al., 2002) (Foster et Johnson, 2001), chez les esquimaux du Groenland (5 %), chez les femmes et chez les personnes de plus de 40 ans (Bonomi et al., 2000).

## II-1-4 Glaucomes à pression normale

Les glaucomes à pression normale (GPN) se présentent comme le GPAO avec une neuropathie optique, des déficits spécifiques du champ visuel, mais avec une PIO normale sans traitement (Mi et al., 2014). La fréquence de ce type de glaucome est très différente selon les études envisagées mais est évaluée en moyenne de 30 à 50 % des glaucomes à angle ouvert. Le GPN est rare avant 50 ans et sa fréquence augmente chez le sujet âgé et est plus répandu chez les femmes.

La pression étant normale dans ce type de glaucome, des facteurs indépendants de la PIO devraient jouer un rôle important dans le développement du GPN comme le stress oxydant ou les facteurs vasculaires. Des patients montrant une diminution du flux sanguin oculaire (Shields, 2008) associé à des vasospasmes ont permis de mettre en évidence le rôle des facteurs vasculaires dans le développement du GPN. En effet, une baisse de perfusion du flux sanguin de la tête du nerf optique pourrait être à l'origine de la dégénérescence des axones des CGR. Il a été aussi montré un rôle possible de la pression intracrânienne via une réduction de la pression du LCR (John P Berdahl et al., 2008) attestant d'une augmentation de la différence de pression translaminaire qui pourrait induire une souffrance axonale lors de la traversée de la lame criblée.

## II-2 Présentation clinico-pathologique du GPAO

Le GPAO est considéré comme une neuropathie optique antérieure, d'évolution chronique et progressive, caractérisée par des altérations du champ visuel et une excavation pathologique du nerf optique. L'élévation de la PIO est le principal facteur de risque de GPAO

### II-2-1 Epidémiologie du GPAO

La prévalence du GPAO dans le monde varie selon les études : entre 1 et 7 %. Le facteur principal de variation est l'origine ethnique. En effet, il est le plus fréquent dans la population noire (4,2 %) puis caucasienne (2,1 %) et enfin asiatique (1,4 %) (Rudnicka et al., 2006). Le GPAO est aussi le plus fréquent des glaucomes en occident et en Afrique avec une représentation de 50 à 70 %. L'âge est considéré comme un facteur de risque majeur de

glaucome. En effet, les sujets atteints de GPAO ont typiquement plus de 60 ans et la prévalence augmente de façon exponentielle pour atteindre 8 % à 80 ans (Tham et al., 2014).

## II-2-2 Facteurs de risque du GPAO

L'élévation de la PIO demeure le principal facteur de risque du GPAO (Mackenzie et Cioffi, 2008) et est intimement liée au défaut d'élimination de l'humeur aqueuse de la chambre antérieure de l'œil. La PIO n'est pas une valeur constante et peut varier au cours du nyctémère (Mottet et al., 2013). La valeur normale de la PIO varie entre les individus. En effet, des données de population générale montrent qu'une PIO dite normale est comprise entre 10 et 21 mmHg (Kwon et al., 2009). Des niveaux de PIO supérieurs à 21 mmHg doivent être un élément d'alerte, mais c'est surtout l'apparition des premières altérations structurales de type glaucomateuses qui doit faire considérer le niveau de PIO comme pathologique. L'élévation de la PIO reste néanmoins le seul facteur de risque accessible à un traitement. Il existe d'autres facteurs de risque associés à la neuropathie glaucomateuse comme les facteurs vasculaires ou certains facteurs biomécaniques. Des anomalies du flux sanguin oculaire ont ainsi été impliquées dans la neuropathie optique glaucomateuse, en particulier, l'hypotension artérielle ou encore les troubles de la vasomotricité qui peuvent être des facteurs aggravants du glaucome. La myopie forte ou encore une pachymétrie fine sont également des facteurs de risque de développement ou d'aggravation d'un glaucome (Mitchell et al., 1999) (Gordon et al., 2002).

## II-2-3 Physiopathologie du GPAO

L'élévation pathologique de la PIO est due à une altération puis à une dégénérescence du trabéculum. L'humeur aqueuse (HA) est éliminée à 90 % par la voie trabéculaire au travers du trabéculum et à 10% par la voie dite uvéosclérale. Le trabéculum est considéré comme un filtre dynamique qui draine l'HA hors de la chambre antérieure de l'œil. Il est situé dans l'angle irido-cornéen sur la totalité de sa circonférence. C'est un tissu conjonctif lacunaire, constitué d'un empilement de lamelles entourées d'endothélium (cellules trabéculaires) dont la structure est accolée au canal de Schlemm. Afin d'être éliminée, l'HA va franchir le trabéculum pour rejoindre le canal de Schlemm puis être évacuée dans les veines épisclérales.

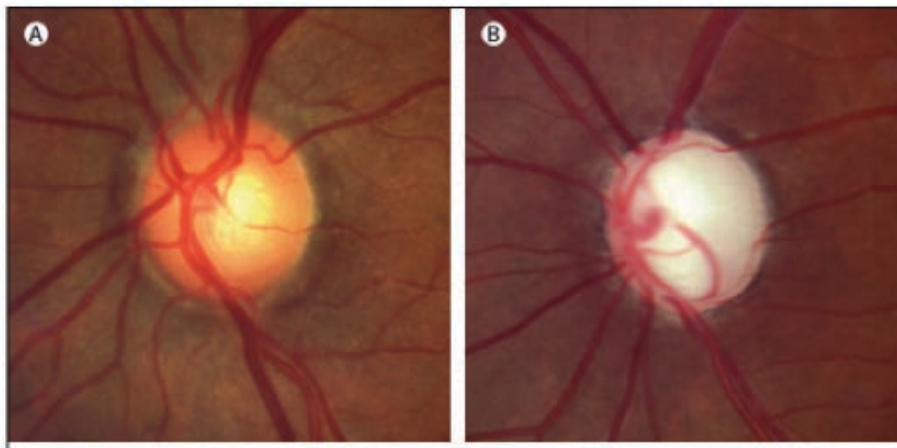
Plusieurs éléments ont été incriminés quant aux mécanismes de dégénérescence du trabéculum, entre autres une diminution pathologique du nombre des cellules trabéculaires et des modifications de sa matrice extracellulaire (Rohen et al., 1993).

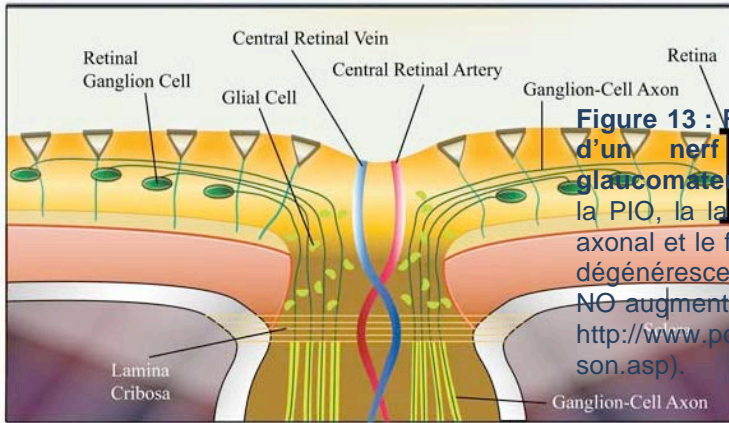
La dégénérescence du trabéculum va engendrer un défaut d'écoulement de l'HA. La résistance à l'écoulement de l'HA au niveau du trabéculum induit une augmentation de la PIO majoritairement responsable de la mort des CGR.

**Figure 12 : Comparaison d'une papille normale et glaucomateuse.** Le disque optique d'un individu sain (A) présente une région centrale pâle (cup ou excavation) et une zone plus foncée qui correspond aux fibres nerveuses rétiniennes. En cas de glaucome (B), l'excavation occupe une proportion plus importante du disque ce qui signe une perte massive des fibres du nerf optique (Adapté d'après Quigley, 2011).

L'excavation papillaire glaucomateuse est souvent le premier signe clinique observé de la neuropathie optique glaucomateuse. L'excavation papillaire correspond à la portion centrale de la tête du nerf optique dépourvue de fibres nerveuses rétiniennes (Figure 12). L'augmentation de la taille de l'excavation résulte de la perte des fibres nerveuses rétiniennes et du réarrangement tissulaire (Quigley et al., 1983) (Figure 13). De plus, la pâleur papillaire est un signe qui peut renseigner sur le niveau d'atrophie des fibres optiques (Figure 12).

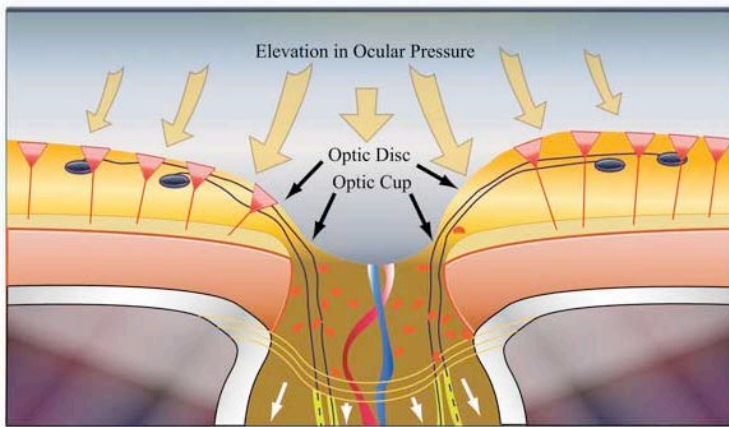
La perte de fonction des fibres du nerf optique engendre une perte du champ visuel (Figure 14). La perte centrale de l'acuité visuelle ne survient qu'à des stades très avancés de la pathologie (Quigley, 2011).





**Figure 13 : Représentation schématique de la tête d'un nerf optique normal (en haut) et glaucomateux (en bas).** En réponse à l'élévation de la PIO, la lame criblée est comprimée, le transport axonal et le flux sanguin sont compromis menant à la dégénérescence des CGR. Le centre de la tête du NO augmente de diamètre avec la pression (D'après <http://www.powerpak.com/customcourses/107641/lesson.asp>).

Figure atteinte



## II-3 Pathogénie de l'altération des cellules ganglionnaires

Les mécanismes à l'origine du développement de la neuropathie optique dans le glaucome demeurent aujourd'hui encore controversés. En effet, la PIO ne serait plus l'unique facteur dans la dégénérescence des CGR mais il y aurait au contraire une combinaison de mécanismes impliqués dans glaucome. Alors que le lieu principal des modifications observées se trouve être la portion laminaire du nerf optique, il est crucial de comprendre l'influence des facteurs pressionnels et non pressionnels sur les changements tissulaires dans cette région.

### II-3-1 Implication du facteur pressionnel dans la compression biomécanique

Longtemps deux théories ont expliqué le développement de la pathologie glaucomateuse, les théories dites mécanique et vasculaire. Un concept plus récent propose de réunir ces composantes sous une même hypothèse appelée théorie biomécanique (Burgoyne et al., 2005).

La lame criblée semble être l'élément clé dans l'atteinte des CGR et sa différence de constitution entre les individus expliquerait les inégalités de résistance face à une augmentation de PIO (Quigley et Addicks, 1981).

L'hypertonie oculaire exerce une force mécanique sur la lame criblée qui va comprimer ses multiples feuillets et par ce biais compresser les axones des CGR qui la traversent. Ce phénomène serait la cause principale de la pathologie glaucomateuse (Quigley et Addicks, 1981).

Chez des patients glaucomateux, il a été montré une augmentation de la quantité d'élastine, présente à l'état normal dans la lame criblée, et une désorganisation de ses fibres avec la progression de la pathologie (Pena et al., 1998). La lame criblée est aussi composée de collagènes, dont la densité diminuerait (Quigley et al., 1991), alors que ses fibres ont un rôle dans la protection mécanique de cette structure. Ces modifications engendreraient une fragilité de la lame criblée face à l'augmentation de la PIO.

De par leur position autour des pores de la lame criblée et de leur rôle dans le maintien d'un environnement extracellulaire par la production de collagène et d'élastine, les astrocytes ont un rôle essentiel dans la survie des axones des CGR au niveau de la lame criblée (Morgan, 2000). Comme nous l'avons évoqué dans la partie I4a, il existe ainsi un gradient de pression translaminaire entre les espaces intra- et extraoculaire. Cette différence de pression pourrait être à l'origine de la pathologie glaucomateuse (Jonas, 2011). En effet, une pression du LCR (compartiment rétrobulbaire) plus faible a été retrouvée chez des patients glaucomateux (John P. Berdahl et al., 2008). Cela induirait une majoration du gradient translaminaire et des contraintes mécaniques exercées sur la lame criblée.

## II-3-2 Implication des facteurs non pressionnels dans la dégénérescence des CGR

La neuropathie glaucomateuse est caractérisée par la mort par apoptose des CGR. Ainsi, plusieurs facteurs contribuent à l'apoptose neuronale glaucomateuse incluant les facteurs neurotrophiques, l'activation gliale, l'excitotoxicité au glutamate et le stress oxydant.

### II-3-2-1 Facteurs neurotrophiques

Les neurotrophines sont des protéines qui exercent un effet sur la survie et la fonction neuronale. La famille des neurotrophines comprend quatre membres principaux : le nerve growth factor (NGF), le brain-derived neurotrophic factor (BDNF), la neurotrophine 3 (NT-3) et la neurotrophine 4/5 (NT-4/5). La réserve principale de neurotrophines pour la rétine est le cerveau et en particulier le colliculus supérieur (CS) pour les CGR (Almasieh et al., 2012). Les neurotrophines sont donc synthétisées dans le CS puis transportées de façon rétrograde jusqu'aux CGR pour exercer leur fonction. L'effet biologique des neurotrophines passe par leur liaison aux récepteurs de la famille tropomyosin related kinase (Trk) et p75<sup>NTR</sup> (p75 neurotrophin receptor) (Huang et Reichardt, 2001).

En cas d'hypertonie oculaire, l'atteinte neuronale observée engendre une défaillance du transport axonal entraînant un défaut de transport rétrograde de BDNF et de NGF, et résulte en une carence de ces facteurs neurotrophiques (Pease et al., 2000) (Quigley et al., 2000). L'hypothèse d'un blocage du transport axonal rétrograde serait donc à l'origine d'un déficit en facteurs neurotrophiques. En effet, une atteinte du transport axonal a été observée dans un modèle de rats glaucomateux (Salinas-Navarro et al., 2010). Ainsi, une supplémentation en BDNF directe ou par transplantation de cellules souches par injection intravitréenne



prolongerait la survie des CGR adultes et contribuerait à la régénération axonale dans des modèles *in vivo* de neuropathie optique (Chen et Weber, 2001) (Mead et al., 2013). De plus, il a été montré qu'une application oculaire de NGF chez un rat glaucomateux engendrerait un effet protecteur sur la dégénérescence des CGR (Colafrancesco et al., 2011), réduirait l'apoptose neuronale et améliorerait la fonction visuelle de patients glaucomateux (Lambiase et al., 2009). En parallèle, sept mutations du gène NT-4 ont été trouvées chez des patients glaucomateux d'origine européenne ce qui suggère son implication dans la pathologie (Pasutto et al., 2009). En outre, une nouvelle mutation du gène codant pour NT-4, identifiée dans la population chinoise, favoriserait la neuropathie glaucomateuse (Vithana et al., 2010).

D'autres neurotrophines d'origine gliale ont été identifiées comme acteurs potentiels de l'apoptose des CGR au cours du glaucome : le facteur ciliaire neurotrophique (CNTF) et le «glial cell line-derived neurotrophic factor» (GDNF). L'injection intravitréenne de cellules souches neurales sécrétant le CNTF paraît avoir des effets neuroprotecteurs sur des CGR lésées chez la souris (Flachsbarth et al., 2014). Le CNTF a été injecté sous forme de transfection virale dans des modèles d'écrasement du nerf optique et a montré également des effets neuroprotecteurs sur les CGR ainsi qu'une action sur la repousse axonale (Leaver et al., 2006). Dans des modèles d'axotomie du nerf optique, il a été montré que le GDNF avait une efficacité moindre sur la neuroprotection que le BDNF (Yan et al., 1999). Le BDNF et le CNTF paraissent donc avoir des effets similaires sur la régénération axonale et la neuroprotection des CGR.

### II-3-2-2 Excitotoxicité du glutamate

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur prédominant dans le SNC et dans la rétine. Il joue un rôle majeur dans la neurotransmission des informations visuelles des photorécepteurs aux cellules bipolaires de la rétine, entre les cellules bipolaires et les CGR puis dans le cerveau (Lukasiewicz, 2005). Il est libéré par les neurones présynaptiques et sa recapture neuronale est effectuée via les récepteurs ionotropiques NMDA (N-méthyl-D-aspartate). L'activation prolongée des récepteurs NMDA via un excès extracellulaire de glutamate entraîne une accumulation du calcium intracellulaire qui va favoriser la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) contribuant à la mort neuronale dans un processus connu sous le nom d'excitotoxicité (Kuehn et al., 2005).

Des études ont rapporté une augmentation pathologique du niveau du glutamate dans le vitré d'animaux ainsi que chez des patients glaucomateux (Dreyer et al., 1996) alors que

d'autres ne l'ont pas identifiée (Carter-Dawson et al., 2002). Les données sur l'excitotoxicité du glutamate dans le glaucome restent très controversées.

D'autres transporteurs non NMDA tel que le transporteur glutamate–aspartate (GLAST) pourraient aussi être impliqués dans le glaucome. En effet, dans un modèle de glaucome à pression normale, plus précisément une souris déficiente pour le transporteur du glutamate GLAST, il a été montré une dégénérescence spontanée des CGR et du nerf optique (Harada et al., 2007). Ces données suggèrent que les transporteurs du glutamate sont nécessaires pour prévenir l'excitotoxicité dans la rétine.

### II-3-2-3 Stress oxydant

Le stress oxydant est la cause d'un déséquilibre entre la production de ROS et leur élimination par des antioxydants, et il a été reconnu comme contribuant à la mort neuronale (Almasieh et al., 2012). L'augmentation du niveau des ROS dans un tissu est un facteur caractéristique des pathologies neurodégénératives. Il prend son origine d'une dysfonction mitochondriale, d'une conformation anormale de protéines et d'un défaut de l'ubiquitination ou du système de dégradation du protéasome (Andersen, 2004).

Des données supportent l'idée que le stress rétinien initié par l'hypertonie oculaire impliquerait une composante oxydative. En effet, des ROS seraient générées non seulement dans des modèles d'élévation aiguë de la PIO mais aussi lors d'élévations modérées ou chroniques (Tezel, 2006). Dans l'humeur aqueuse de patients atteints de GPAO et de glaucome par fermeture de l'angle, une diminution significative de l'activité d'enzymes détoxifiantes telles que la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPx) a été observé (Goyal et al., 2014). Ces résultats suggèrent qu'une augmentation des ROS jouerait un rôle dans la pathogénie du glaucome. Au niveau expérimental, dans un modèle d'hypertonie oculaire induite par des injections d'acide hyaluronique intraoculaire, le niveau d'antioxydant est diminué, parallèlement à l'augmentation de la peroxydation des lipides rétiniens (Moreno et al., 2004). De plus, dans un modèle de cautérisation des veines épisclérales (induisant une élévation de la PIO), une amplification de la production de ROS et de la peroxydation des lipides ont été observées dans la rétine (Ko et al., 2005).

Les causes de la dégénérescence des CGR semblent multifactorielles, cependant le stress oxydant y joue un rôle majeur. En cas d'excès de ROS, ces molécules critiques vont activer des voies apoptotiques *via* les caspases (Tezel, 2006) et peuvent être directement toxiques pour les CGR et ainsi contribuer à la dégénérescence en affectant les cellules gliales, immunitaires ou le trabéculum (Chrysostomou et al., 2013).

### II-3-2-4 Activation des cellules gliales

L'activation des cellules gliales est un facteur important pouvant contribuer à la mort des CGR dans le glaucome. En conditions normales, les cellules gliales fournissent un support métabolique et neurotrophique aux CGR, elles maintiennent l'homéostasie rétinienne et ont une fonction de phagocytose lors d'une lésion. Comme nous l'avons vu précédemment, la rétine est composée de trois types de cellules gliales : les astrocytes, les cellules de Müller et les microglies. La GFAP est exprimée, en conditions normales, par les astrocytes mais sa synthèse est significativement plus élevée, en cas de glaucome, dans les astrocytes et les cellules de Müller (Wang et al., 2000a). L'augmentation rétinienne de la GFAP apparaît comme étant un événement précoce dans la pathogénie du glaucome.

Les cellules gliales apportent un certain support aux CGR et la défaillance de ce système peut être une cause de leur mort. Il a été montré, en cas d'activation gliale, une augmentation de l'expression de substances nocives pour les CGR comme des cytokines proinflammatoires, des ROS et du monoxyde d'azote (Kuehn et al., 2005). En effet, des niveaux élevés d'ARN messager et de protéine TNF $\alpha$  ont été trouvés au niveau de la tête du nerf optique d'yeux glaucomateux comparé à des yeux contrôles (Yan et al., 2000a). Cette surexpression a été détectée principalement dans les cellules gliales.

La production pathologique de monoxyde d'azote (ou oxyde nitrique) est un autre stimulus de l'apoptose des CGR (Morgan et al., 1999). Une augmentation de l'expression de l'isoforme 2 de l'oxyde nitrique synthase (NOS) a été détectée dans les astrocytes au niveau de la tête du nerf optique d'un œil de patient glaucomateux (Liu et Neufeld, 2000). Dans un modèle de cautérisation des veines épisclérales, des niveaux d'expression élevés des isoformes de NOS ont été aussi observés au niveau de la tête du nerf optique (Shareef et al., 1999) (Vidal et al., 2006). Ces observations indiquent un rôle certain des NOS dans la pathologie glaucomateuse mais cela reste toutefois en cours d'exploration.

## II-4 Modèles animaux de glaucome

Les modèles expérimentaux de glaucome fournissent des éléments essentiels dans la compréhension de ses mécanismes. Ils sont en effet très utiles quant à l'étude des effets de la PIO sur les tissus oculaires ainsi qu'à l'évaluation du potentiel thérapeutique de nouvelles molécules.

Plusieurs caractéristiques clés du glaucome ont été définies quant à l'obtention d'un bon modèle expérimental (Lasker/IRRF Initiative, 2010). Il s'agit de :

- La perte régionale des CGR
- La lésion des axones des CGR au niveau de la tête du nerf optique
- La perte sélective des CGR tandis que les autres types neuronaux demeurent intacts

Une des principales approches expérimentales a été d'élever la PIO à un niveau tel que les CGR étaient affectées en premier sans causer de lésions accessoires dans la rétine ou dans d'autres structures oculaires (Levkovitch-Verbin, 2004). De plus, le remodelage ou l'excavation du nerf optique sont aussi des caractéristiques clés du glaucome mais ne sont pas les premiers critères de choix pour un modèle expérimental. Les modèles animaux sont généralement divisés en deux groupes, les modèles héréditaires et les modèles induits expérimentalement (Howell et al., 2008). Les modèles héréditaires présentent l'avantage de pouvoir montrer une forme chronique et liée à l'âge de la pathologie glaucomateuse, ce qui se rapproche de la pathologie humaine. Les modèles induits dans lesquels la PIO est élevée expérimentalement sont plus faciles d'utilisation.

Nous allons nous attacher à décrire ici les principaux modèles utilisés et développer plus particulièrement le modèle de cautérisation des veines épisclérales que nous avons choisi pour nos expérimentations.

#### II-4-1 Modèle génétique DBA/2J

Les souris DBA/2J développent une forme héréditaire de glaucome liée à l'âge (John et al., 1998). A l'âge de trois à six mois, ces souris développent une obstruction trabéculaire due à une dispersion pigmentaire (atrophie irienne) suivie de l'augmentation de la PIO et d'une lésion du nerf optique (Anderson et al., 2006). L'augmentation de la PIO chez ces animaux apparaît entre trois et huit mois et reste stable jusqu'à la mort (Bosco et al., 2008) (Rumelt, 2011). Elle est comprise entre 22 et 23 mmHg pour les souris DBA/2J et autour de 15 mmHg pour les souris contrôles (Inman et al., 2006). Les souris DBA/2J portent des mutations récessives dans deux gènes : *Gpnmb* (*glycosylated protein nmb*) et *Tyrp1* (*tyrosinase-related protein 1*). Ces mutations sont la cause d'anomalies des mélanosomes de l'iris se traduisant en une réponse inflammatoire contre l'iris (Libby et al., 2005).

## II-4-2 Photocoagulation trabéculaire

Une des approches pour élever la PIO expérimentalement est de réduire l'écoulement de l'humeur aqueuse par photocoagulation du trabéculum à l'aide d'un laser. Ce modèle a été initialement développé chez le singe rhésus dans les années 70 puis plus récemment chez le rongeur pour l'étude du glaucome à angle ouvert.

Ce modèle consiste à envoyer un faisceau de laser argon sur toute la circonférence du trabéculum (Gaasterland et Kupfer, 1974). Il en résulte une augmentation de la PIO chez 70 % des animaux ainsi qu'une perte sélective des CGR et un amincissement de la couche des fibres optiques par rapport aux animaux contrôles. Chez le rongeur, le traitement au laser est répété une seconde fois au bout d'une semaine. Au niveau de l'œil traité, la PIO est d'environ 35 à 40 mmHg et reste plus haute que celle des contrôles pendant au moins trois semaines (Levkovitch-Verbin et al., 2002). Ce modèle est fiable, reproductible et simple à produire mais il ne permet pas l'étude de la physiopathologie du trabéculum du fait de sa destruction directe.

## II-4-3 Obstruction trabéculaire par microbilles

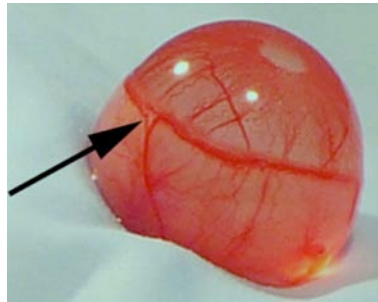
Ce modèle consiste en une ou plusieurs injections de microbilles de latex dans la chambre antérieure de l'œil qui vont obstruer le trabéculum. Ce modèle a été en premier développé chez le singe rhésus (Weber et Zelenak, 2001). Deux injections par semaine pendant un mois sont nécessaires afin de produire une élévation de la PIO entre 25 et 35 mmHg selon les animaux, alors que les contrôles sont à 15 mmHg.

Ce modèle a ensuite été adapté au rongeur (J Haritz Urcola et al., 2006) (Sappington et al., 2010). Les rats injectés avec une solution de microbilles montrent une élévation de la PIO jusqu'à 30 mmHg qui reste stable pendant treize jours et résulte en une densité d'axones du nerf optique plus basse de 16 % comparé au lot contrôle. Pour une augmentation de la PIO d'environ 30 % et stable pendant deux semaines, une seule injection est nécessaire. Une seconde injection peut étendre l'élévation à huit semaines.

Ce modèle permet d'obtenir une élévation de la PIO soutenue avec seulement quelques injections. Cependant l'étude morphologique du trabéculum est altérée par la présence des billes.

#### II-4-4 Injection épisclérale de solution salée hypertonique

Le modèle par injection épisclérale de solution salée hypertonique a été développé uniquement chez le rat et consiste en l'injection de solution physiologique hypertonique dans les veines épisclérales (Morrison et al., 1997). Les veines épisclérales sont un réseau de veines qui entourent le limbe (frontière entre la cornée et la sclère) et qui reçoivent l'humeur aqueuse provenant du trabéculum (Figure 15). L'hypertonie de la solution produit des lésions des membranes cellulaires et du trabéculum. L'élévation de la PIO résultant de cette procédure apparaît entre 7 et 10 jours après l'injection et est dépendante du degré d'obstruction du trabéculum ce qui engendre beaucoup de variabilité dans la PIO. Comme les autres formes d'hypertension oculaire chez le rongeur, ce modèle montre une perte progressive des CGR et une dégénérescence du nerf optique.



#### II-4-5 Cautérisation des veines épisclérales

Le modèle expérimental de glaucome par cautérisation des veines épisclérales chez le rat a été développé par Shareef et ses collaborateurs en 1995 (Shareef et al., 1995). Cette méthode est moins invasive que la méthode de photocoagulation du trabéculum par laser et n'induit pas de complications dans la chambre antérieure de l'œil.

La technique chirurgicale se déroule sous anesthésie générale et sous microscope. Elle consiste à réaliser une dissection conjonctivo-sclérale au niveau du limbe dans les quadrants supéro-temporal, supéro-nasal et inféro-nasal. Les veines épisclérales (trois veines sur quatre au total) sont identifiées dans les quadrants et sont isolées par dissection. Elles sont ensuite cautérisées par électrocoagulation bipolaire jusqu'à l'obtention d'un moignon turgescents signant un obstacle total au retour veineux. L'humeur aqueuse ne

pouvant être évacuée, la PIO augmente très rapidement après la chirurgie. L'effet hypertonisant de la procédure expérimentale est obtenu chez 80 % des animaux opérés. Les rats ne présentant pas d'hypertonie oculaire ont été exclus à l'issue de l'expérimentation.

Il a été montré chez des rats Wistar que la cautérisation des veines épisclérales entraînait une augmentation de la PIO de 14 mmHg à environ 50 mmHg, et ce de façon stable pendant 2 à 4 semaines (Shareef et al., 1995).

Néanmoins, peu de données sont accessibles quant à la structure du segment antérieur après cautérisation des veines épisclérales. Une étude utilisant les ultrasons à hautes fréquences *in vivo* a montré que la cautérisation des veines épisclérales n'induisait pas de variation morphologique des éléments du segment antérieur, en particulier la profondeur de la chambre antérieure, l'ouverture de l'angle iridocornéen et la taille des corps ciliaires, contrairement à l'injection intraveineuse de solution salée hypertonique (Nissirios et al., 2008).

La cautérisation des veines épisclérales induit une atrophie rétinienne. Plusieurs études ont montré que cela provoquait une apoptose des CGR et la synthèse de facteurs neurotrophiques et de médiateurs de l'inflammation (J. Haritz Urcola et al., 2006) (Danas et al., 2006) (Park et al., 2008). De plus, deux études ont montré que les lésions rétiniennes après cautérisation apparaissaient dans des régions périphériques de la rétine (Sawada et Neufeld, 1999) (Ko et al., 2001).

## III Le glaucome, une neuropathie optique neurodégénérative inflammatoire

La neuro-inflammation dans la pathologie glaucomateuse devient une composante de plus en plus importante du fait du rôle des cellules immunitaires et gliales aux stades précoces de la pathologie. En effet, les astrocytes, les microglies et les cellules monocytaires sont définis comme étant des acteurs critiques de la réponse neuro-inflammatoire dans le glaucome. Etant un site de privilège immun, le SNC est en communication limitée avec le système immunitaire (Ransohoff et Brown, 2012) et la réponse immunitaire est donc organisée par un nombre restreint de cellules.

### III-1 Réactivité gliale et infiltration des cellules immunitaires dans les modèles expérimentaux de glaucome

Le processus de la perte de la vision dans le glaucome est connu pour être associé à des altérations des propriétés fonctionnelles et de la distribution des cellules gliales dans la rétine et au niveau de la tête du nerf optique mais aussi dans les voies visuelles postérieures. Ces changements sont répertoriés comme étant un état d'activation des cellules gliales.

#### III-1-1 Activation de la macroglie

Les astrocytes sont les cellules gliales majoritaires au niveau de la tête du nerf optique. Ils sont arrangés en colonnes de façon à séparer les faisceaux d'axones avec leurs prolongements qui sont orientés perpendiculairement aux fibres des CGR (Johnson et Morrison, 2009). Les astrocytes réactifs sont caractérisés par une hypertrophie, une hyperplasie et une augmentation de la coexpression de la GFAP et de la vimentine (Ridet et al., 1997).



La réactivité des astrocytes a été caractérisée en premier lieu chez les patients glaucomateux. Il a été montré des changements de morphologie des astrocytes et de l'intensité de l'immunoréactivité de la GFAP dans le nerf optique de patients atteints de GPAO (Quigley et al., 1981) ainsi que dans la rétine de patients glaucomateux (Tuccari et al., 1986) (Wang et al., 2001).



**Figure 16 : Marquage immunohistochimique de la GFAP (marron) d'une rétine normale (A) et de patient glaucomateux (B) après coloration à l'hématoxyline éosine.** Dans la rétine normale, seulement quelques astrocytes sont marqués alors qu'une augmentation du marquage GFAP est visible dans la rétine glaucomateuse. La tête de flèche montre des cellules de Müller activées et l'étoile montre un immunomarquage soutenu de la GFAP des astrocytes autour d'un vaisseau sanguin dans la rétine glaucomateuse (D'après Wang et al., 2001).

Cette réactivité astrocytaire est aussi observée dans des modèles expérimentaux de glaucome. Tout d'abord chez le primate non humain, dans un modèle par photocoagulation du trabéculum par laser où il a été montré une surrégulation au niveau protéique de la GFAP dans la rétine (Tanihara et al., 1997). Mais aussi dans des modèles de rongeurs, par exemple chez le rat où l'on a induit un glaucome par cautérisation des veines du limbe (Wang et al., 2000b). Dans la rétine de ces animaux, une expression augmentée de la GFAP a été observée pendant les deux premiers mois qui ont suivi l'opération. Une autre équipe a montré que, dans un modèle aigu d'hypertension oculaire par perfusion de la chambre antérieure chez le rat, l'activation macrogliale apparaissait avant la perte des CGR (Zhang et al., 2009). De plus, l'immunoréactivité de la GFAP était largement augmentée dans le corps genouillé latéral (CGL) et le colliculus supérieur (CS) controlatéraux à l'œil

lésé de ces animaux dès trois jours et jusqu'à quatre semaines. Un modèle de souris par photocoagulation des veines épisclérales a montré une réactivité exacerbée de la GFAP dans les CS ipsilatéraux et controlatéraux une semaine après la chirurgie mais de façon moins prononcée dans le CS ipsilatéral (Dekeyster et al., 2015). La gliose réactionnelle au niveau des centres supérieurs (CGL et cortex visuel) a été observée également chez le primate non humain dans un modèle de photocoagulation du trabéculum (Sasaoka et al., 2008) (Lam et al., 2009a).

Un élément cellulaire lié à l'activation astrocytaire est l'existence de jonctions communicantes entre les cellules. Les prolongements des astrocytes sont connectés entre eux grâce aux jonctions communicantes qui forment un réseau fonctionnel permettant aux astrocytes de communiquer et de maintenir l'homéostasie ionique et métabolique (Rose et Ransom, 1997). Les jonctions communicantes des astrocytes sont formées principalement par la connexine 43 qui appartient à une classe de canaux ioniques. Une théorie dans l'atteinte des CGR dans le glaucome mettrait en cause les jonctions communicantes comme médiateurs de la mort des CGR (Hernandez et al., 2008). Des cultures primaires d'astrocytes de donneurs normaux et glaucomateux ont permis de montrer une expression plus importante du gène codant pour la connexine 43 dans les astrocytes de patients glaucomateux (Hernandez et al., 2008). De plus, dans la rétine et au niveau de la lame criblée de patients glaucomateux, une expression augmentée de l'immunoréactivité de la connexine 43 a été observée en association avec une activation gliale (Kerr et al., 2011).

Comme nous l'avons vu au chapitre 1, les cellules de Müller (CM) sont les cellules gliales majoritaires de la rétine. La gliose des CM est caractérisée par une augmentation de l'expression de la GFAP et une activation de la voie ERK dans des modèles génétiques ou inductibles de glaucome (Tanihara et al., 1997) (Tezel et al., 2003) (Inman et Horner, 2007). Les CM sont parmi les premières à répondre après une hypertension oculaire. Leur activation est détectée dès deux-trois jours après la lésion oculaire et persiste pendant plusieurs mois (Kanamori et al., 2005). Dans un modèle de souris DBA/2J, l'hypertrophie des CM est détectable avant même l'augmentation de la pression intraoculaire (PIO) (Inman et Horner, 2007).

### III-1-2 Activation microgliale

Les microglies sont des cellules immunitaires qui résident dans le SNC. En réponse à une lésion, elles deviennent activées et leur morphologie change d'un état ramifié à un état amiboïde (Karlstetter et al., 2014).

Les microglies réactives ont été trouvées tout d'abord au niveau de la tête du nerf optique chez des patients glaucomateux (Yuan et Neufeld, 2001) (Neufeld, 1999). Elles ont été également retrouvées dans plusieurs modèles expérimentaux génétiques ou inductibles de glaucome. En effet, chez la souris DBA/2J, l'activation microgliale est détectée dès trois mois, indiquant que c'est un évènement précoce dans la pathologie glaucomateuse (Bosco et al., 2011). Il en va de même dans un modèle de cautérisation des veines du limbe chez le rat où l'expression du marqueur microglial OX42 est augmentée durant les deux premiers mois après l'opération (Wang et al., 2000b). Une autre étude montre que l'augmentation de l'immunoréactivité et de la densité microgliale dans la rétine et le nerf optique apparaît avant tout signe de perte des CGR dans un modèle de photocoagulation du trabéculum (Ebnetter et al., 2010). Chez la souris DBA/2J, il a été montré que les microglies étaient les seules cellules gliales à proliférer dans la rétine au cours de la pathologie (Inman et Horner, 2007), les autres types présentant une hypertrophie seulement. Des niveaux significativement plus élevés d'ARN messager (ARNm) du gène *Iba1* (*Ionized calcium binding adaptor molecule 1*), reflétant une activation microgliale, ont été retrouvés au niveau de la tête du nerf optique dans un modèle de glaucome par injection épisclérale de solution salée hypertonique (Johnson et al., 2007).

L'activation et la prolifération microgliale peuvent avoir un effet néfaste sur les CGR par la sécrétion microgliale de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6 ou TNF $\alpha$  ou de ROS (Hanisch et Kettenmann, 2007). Le rôle des microglies n'est pas encore bien établi mais des stratégies visant à inhiber les microglies réactives, et donc les molécules pro-inflammatoires qu'elles sécrètent, se mettent en place. En effet, dans le modèle chronique de glaucome DBA/2J, le traitement à la minocycline, un agent connu pour réduire l'activation microgliale et améliorer la survie neuronale, semble avoir un effet protecteur sur les CGR (Bosco et al., 2008). De plus, dans un modèle de photocoagulation par laser, la délétion du récepteur microglial CD11b prévient l'activation microgliale et est neuroprotectrice (Nakazawa et al., 2006a).

Dans un modèle de glaucome par perfusion de la chambre antérieure avec une solution salée hypertonique, il a été montré que la déficience du récepteur à la Fractalkine, CX3CR1, renforçait la neurotoxicité microgliale et induisait une perte des CGR plus importante (Wang et al., 2014). Ces résultats suggèrent que CX3CR1 module l'activation de la microglie lors d'une hypertension oculaire. La suppression de l'activation de la microglie semble être un traitement potentiel afin de ralentir la progression du glaucome et d'améliorer la survie des CGR.

### III-1-3 Migration transendothéliale des monocytes

Le rôle de l'infiltration des monocytes dans le glaucome n'est pas encore bien défini. Cependant, il existe quelques travaux dans ce domaine. En effet, dans un modèle de souris DBA/2J, il a été montré que les monocytes circulants infiltraient la rétine et le nerf optique à des stades précoces de la pathologie (Howell et al., 2012). Les autres types de cellules immunitaires n'ont pas été retrouvés dans la rétine de ces animaux. L'infiltration des monocytes est cependant bloquée après un traitement de radiothérapie localisé entraînant une meilleure survie des CGR. L'infiltration des monocytes semble donc être un événement important dans la mort des CGR lors d'un glaucome. Comme nous l'avons vu précédemment, dans un modèle de photocoagulation par laser, la délétion du récepteur microglial CD11b prévient l'activation microgliale/macrophagique et est neuroprotectrice (Nakazawa et al., 2006a). Cette étude ne fait cependant pas la distinction entre les microglies résidentes et les monocytes infiltrant. D'autres études sont bien entendu nécessaires pour une meilleure compréhension de la contribution des infiltrats monocytaires dans la progression du glaucome.

## III-2 Voies de signalisation pro-inflammatoires dans le glaucome

Les éléments déclencheurs de la réponse inflammatoire dans le glaucome ne sont pas encore bien définis. Cependant, nous avons vu que les processus inflammatoires dirigés par les cellules gliales jouent un rôle prépondérant dans la pathologie. Une étude utilisant des approches transcriptomiques a identifié une augmentation de l'expression de gènes associés à des voies inflammatoires au niveau de la tête du nerf optique chez le patient glaucomateux (Nikolskaya et al., 2009). Il a été montré une augmentation de l'expression de gènes responsables de l'initiation de l'inflammation, comme les *TLR* (*Toll like receptor*), ou amplificateur de l'inflammation comme le gène  $TNF\alpha$  chez des patients glaucomateux (Luo et al., 2010) (Yang et al., 2011) (Tezel et al., 2012).

### III-2-1 Voie des récepteurs de type Toll

Des analyses chez des patients et des modèles expérimentaux de glaucome suggèrent que la réponse immunitaire est orchestrée en partie par les TLR. Des analyses protéomiques chez des patients glaucomateux ont pour l'instant révélé une augmentation de la régulation des voies des TLR (Luo et al., 2010).

Les récepteurs de type Toll font partie de l'immunité innée et toute la difficulté réside en la reconnaissance des organismes pathogènes. Ainsi, durant l'évolution, certains déterminants moléculaires de ces derniers ont été sélectionnés pour être reconnus de façon certaine, ils sont appelés les PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns). Les PAMP sont spécifiques des organismes pathogènes et n'ont donc pas d'équivalence chez l'hôte (protection du soi) et ce sont des structures indispensables à la survie et/ou au caractère invasif des micro-organismes. Parmi les PAMP les plus connus figurent le lipopolysaccharide (LPS) bactérien et l'ARN viral double brin. Actuellement, dix récepteurs de type Toll ont été décrits chez les mammifères (TLR1-TLR10) (Aderem et Ulevitch, 2000). De plus en plus d'études supportent que des ligands induits par le stress glaucomateux (produits d'oxydation) pourraient activer les TLR de la glie (Luo et al., 2010). Des analyses immunohistochimiques ont montré une expression augmentée de TLR2, TLR3, et TLR4 dans la microglie et les astrocytes de rétine de patients glaucomateux (Luo et al., 2010). De plus, une étude récente a évalué, par des approches protéomiques, la réponse astrocytaire dans un modèle de glaucome par injection épisclérale de solution salée hypertonique (Tezel et al., 2012) ; ces auteurs ont mis en lumière la voie des TLR et l'activation de NF- $\kappa$ B (Nuclear factor-kappa B) comme étant des éléments de la réponse inflammatoire astrocytaire. En effet, la voie NF- $\kappa$ B est connue pour mener à l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Une autre étude a montré que l'inactivation du NF- $\kappa$ B astroglial réduisait l'environnement inflammatoire et améliorait la survie des CGR après une ischémie rétinienne (Dvorianchikova et al., 2009).

### III-2-2 Voie du TNF $\alpha$

Le TNF $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire qui est principalement synthétisée par les macrophages et les lymphocytes T activés mais aussi par les astrocytes et la microglie dans le SNC. Sa réponse cellulaire est orchestrée à travers deux récepteurs distincts TNFR1 (Tumor necrosis factor receptor 1) et TNFR2 (Aggarwal, 2003) (Almasieh et al., 2012).

De plus en plus d'études suggèrent un rôle important du TNF $\alpha$  dans la pathologie glaucomeuse. Les changements attribués au glaucome ont été corrélés avec le TNF $\alpha$  chez le patient glaucomateux ainsi que dans des modèles expérimentaux de glaucome. Il a été montré un niveau élevé de TNF $\alpha$  dans l'humeur aqueuse de patients atteints de GPAO

mais aussi de glaucome à pression normale (Sawada et al., 2010). Un niveau élevé de TNF $\alpha$  a été observé dans le sérum de patients atteint de glaucome sévère en comparaison avec des sujets non atteints (Huang et al., 2010). Des niveaux élevés de TNF $\alpha$  ont été retrouvés dans la rétine et dans les astrocytes et la microglie du nerf optique de patients glaucomateux (Yuan et Neufeld, 2000) (Yan et al., 2000b) (Tezel et al., 2001). L'apport extérieur de TNF $\alpha$  par injection intravitréenne chez des lapins et des souris normales a montré l'induction de dommages axonaux du nerf optique comparable à ceux observés chez les patients glaucomateux (Madigan et al., 1996) (Nakazawa et al., 2006b). La déficience en TNFR1 mène à une neuroprotection des CGR dans un modèle de lésion du nerf optique (Tezel et al., 2004) et un déficit de TNFR2 résulte en une augmentation de la survie des CGR dans un modèle d'hypertension oculaire induite par laser (Nakazawa et al., 2006b). De plus, des polymorphismes du gène TNF $\alpha$  ont été corrélés avec une incidence accrue de GPAO chez des patients glaucomateux (Fan et al., 2010) (Bozkurt et al., 2011). Ainsi, la coexistence de l'augmentation de l'expression de TNF $\alpha$  et les changements glaucomateux implique clairement le TNF $\alpha$  dans la pathogenèse de la perte des CGR dans le glaucome.

### III-3 Le glaucome est-il une pathologie neuro-dégénérative ?

Comme nous l'avons vu précédemment, la PIO est le facteur de risque principal du glaucome sur lequel les cliniciens peuvent évaluer les traitements antiglaucomateux. Cependant, malgré le contrôle de la PIO, des patients continuent de perdre la vue (Gupta et Yücel, 2007) ce qui suggère l'intervention de mécanismes indépendants de la PIO contribuant à la progression de la pathologie. Ces mécanismes semblent être similaires à ceux observés dans les pathologies neurodégénératives. Le corps cellulaire des CGR est situé dans la rétine mais la majeure partie de la cellule n'est pas située dans l'œil. De nombreuses études sur des modèles animaux et chez l'homme semblent indiquer que l'atteinte axonale s'étend du nerf optique aux voies optiques postérieures. Dans ce contexte, s'intéresser aux événements qui surviennent dans ces voies visuelles devient pertinent. En effet, les constatations de ces changements dans le cerveau proviennent d'études neuropathologiques et de neuro-imagerie.

### III-3-1 Neuro-imagerie des anomalies cérébrales de patients glaucomateux

De nombreuses données semblent signifier que la pathologie glaucomateuse aboutit à une atteinte de la voie visuelle rétinohalamique majoritairement. En effet, 80 à 90 % des cellules ganglionnaires projettent sur le corps genouillé latéral (CGL) (Gupta et Yücel, 2007). L'analyse par imagerie par résonance magnétique (IRM) du cerveau des patients glaucomateux a permis une observation de l'ensemble des neurones secondaires visuels.

Grâce à des images IRM du chiasma optique, une étude a montré que tous les patients glaucomateux unilatéraux présentaient une atteinte bilatérale de leurs voies visuelles avec une prédominance du côté cliniquement symptomatique (Iba-Zizen et al., 2008). Une étude plus ancienne avait montré à l'aide de tissus provenant de patients glaucomateux que leur CGL présentait une densité plus faible en neurones que les contrôles (Chaturvedi et al., 1993). Plus récemment, des études en IRM de cerveaux de patients glaucomateux ont confirmé l'atrophie du CGL (Gupta et al., 2009) (Dai et al., 2011) (Hernowo et al., 2011) (Figure 17) et une diminution de l'épaisseur corticale des voies visuelles (Yu et al., 2015). La technique d'imagerie en tenseur de diffusion, qui permet de quantifier des anomalies de la substance blanche, a été utilisée chez des patients glaucomateux et démontre des changements de la substance blanche au niveau des radiations optiques qui projettent sur le cortex visuel (Garaci et al., 2009) (Engelhorn et al., 2011) (Zikou et al., 2012). Une comparaison de la matière grise en IRM entre des groupes de patients glaucomateux et de contrôles a révélé une réduction de la densité de la matière grise dans le cortex visuel primaire (Boucard et al., 2009) (Li et al., 2012). Enfin, une étude d'IRM fonctionnelle au repos a montré une altération de la connectivité fonctionnelle entre le cortex visuel primaire et les aires visuelles associatives (secondaires) (Dai et al., 2013).

Ces études non invasives de neuro-imagerie structurale et fonctionnelle chez le patient glaucomateux mettent en lumière des anomalies cérébrales des structures des voies visuelles comme une atrophie, une perte de densité ou une altération de la communication entre les aires visuelles.

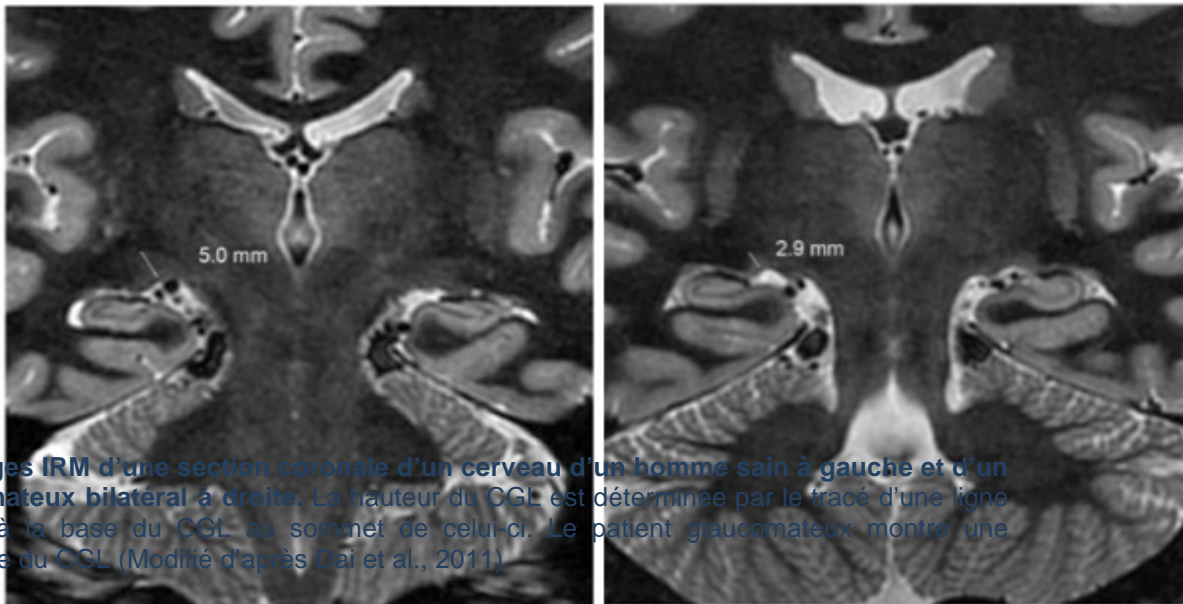


Figure 17 : Images IRM d'une section coronale d'un cerveau d'un homme sain à gauche et d'un patient glaucomateux bilatéral à droite. La hauteur du CGL est déterminée par le tracé d'une ligne perpendiculaire à la base du CGL au sommet de celui-ci. Le patient glaucomateux montre une atrophie bilatérale du CGL (Modifié d'après Dai et al., 2011).

### III-3-2 Etude neuropathologique de la dégénérescence neuronale dans les voies visuelles

Les pathologies neurodégénératives partagent plusieurs caractéristiques fondamentales, dont une perte neuronale, spécifique à chaque pathologie. La perte de ces populations neuronales et les troubles cliniques associés sont corrélés avec la fonction spécifique de ces neurones. En effet, chez des patients glaucomateux, la perte du champ visuel a été corrélée avec l'augmentation de la neurodégénérescence des CGR (Harwerth et Quigley, 2006). La perte progressive des CGR est donc une caractéristique de la pathologie glaucomateuse. Mais qu'en est-il des neurones secondaires des voies visuelles postérieures ?

Les premières observations ont été faites chez le patient glaucomateux. Une étude a montré, à l'aide de coupes histopathologiques, une diminution de la densité en neurones du CGL (Chaturvedi et al., 1993). Des lésions des structures des voies visuelles ont été observées dans un cas de glaucome avancé. En effet, les analyses neuropathologiques ont montré une dégénérescence de la portion intracraniale du nerf optique, du CGL (Figure 18) et du cortex visuel (Gupta et al., 2006).





**Figure 18 : Sections de CGL colorées au Nissl de sujet sain (à gauche) et de patient glaucomateux (à droite).** Le CGL de patient est complètement atrophié par rapport au CGL du sujet sain du même âge (Modifié d'après Gupta et al., 2006).

Chez le primate, les modèles expérimentaux de glaucome semblent montrer de grandes similitudes au niveau anatomique des voies visuelles avec l'homme (Kaplan, 2012).

Une toute première étude d'un modèle de glaucome chez le macaque par photocoagulation par laser du trabéculum a montré dans le CGL une diminution du marquage de la synaptophysine, une protéine synaptique, signant une diminution de la connectivité (Vickers et al., 1997). En général, les modèles de glaucome chez le primate présentent une dégénérescence du CGL incluant un rétrécissement du corps cellulaire et une perte neuronale. En effet, dans un modèle d'hypertension oculaire chez le singe, une diminution du champ visuel, du nombre de CGR et de la densité neuronale du CGL a été observée (Sasaoka et al., 2008). De plus, des évaluations quantitatives des neurones du CGL identifiés avec un marquage à la parvalbumine montre une dégénérescence neuronale dans les couches magnocellulaire et parvocellulaire qui projettent sur le cortex visuel (Yücel et al., 2000) (Weber et al., 2000), ainsi qu'un rétrécissement du corps cellulaire (Yücel et al., 2001).

Des modèles non primates ont aussi décrit des changements anatomiques des cibles des CGR dans le cerveau. Dans un modèle d'hypertension oculaire par perfusion des veines épisclérales d'une solution salée, les auteurs ont mis en évidence un rétrécissement et une perte dendritique des neurones du SC de façon majoritaire et du CGL (Liu et al., 2014).

Les connaissances actuelles du système visuel des rongeurs en font un modèle intéressant d'étude des voies visuelles de la pathologie glaucomateuse.

## *Objectifs généraux*

---

Comme nous l'avons décrit précédemment le glaucome est la première cause de cécité irréversible dans le monde et demeure un problème de santé publique du fait du manque de connaissances physiopathologiques. L'inflammation apparaît comme étant un élément clé dans la progression de la pathologie. En effet, une réactivité des cellules gliales a été observée dans les tissus nerveux de patients glaucomateux ainsi que dans des modèles expérimentaux d'hypertension oculaire. De plus, nous savons que l'augmentation de la PIO induit une dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) et de leurs axones au niveau du nerf optique. De nombreuses études ont également montré que les lésions neuronales ne se limitaient pas à la rétine mais qu'elles auraient un retentissement jusqu'aux voies visuelles postérieures. En outre, il a été montré que l'œil controlatéral à la lésion présentait également une gliose réactionnelle. A ce jour, seulement très peu d'études ont étudié l'effet de molécules anti-inflammatoires alors que cela pourrait offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques neuroprotectrices pour le glaucome.

Dans ce contexte, nous trouvons donc intéressant d'étudier les processus inflammatoires dans le glaucome. Pour ce faire, nous avons choisi le modèle d'hypertension oculaire par cautérisation des veines épisclérales chez le rat. Les objectifs de cette thèse ont été (i) de caractériser l'atteinte des CGR dans notre modèle, (ii) d'étudier et de caractériser les marqueurs clés de l'inflammation dans les structures visuelles de la rétine et jusqu'aux voies postérieures des côtés ipsi- et controlatéraux, (iii) de déterminer le mode de transmission de la neuro-inflammation à l'œil controlatéral.

## *Chapitre 2 : Résultats expérimentaux*

---

*Publication : Bilateral neuro-inflammatory processes in visual pathways induced by unilateral ocular hypertension in the rat*

---

L'hypertonie oculaire unilatérale chez le rat induit des processus bilatéraux dans les voies visuelles.

**Anaïs Sapienza**, Anne-Laure Raveu, Elodie Reboussin, Christophe Roubéix, Céline Boucher, Julie Degardin, Annabelle Reaux-Le Goazigo, Christophe Baudouin, Stéphane Melik Parsadaniantz

# I Présentation de l'article

La neuropathie glaucomateuse se caractérise par la dégénérescence du trabéculum, responsable de l'augmentation de la pression intraoculaire (PIO) et des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR). Les traitements actuels visent principalement à baisser la PIO, cependant certains des patients traités continuent de perdre la vue suggérant un mécanisme autre, indépendant de l'élévation de la PIO. De plus en plus de données cliniques montrent que la neurodégénérescence ne survient pas seulement au niveau de la rétine mais aussi au niveau des neurones des structures cibles des CGR dans le cerveau, le corps genouillé latéral (CGL) chez l'homme (Chaturvedi et al., 1993) (Gupta et al., 2006). Associée à cette neurodégénérescence, une gliose réactionnelle (microglies, astrocytes et cellules de Müller) est également détectée dans la rétine chez des patients glaucomateux présentant une hypertension oculaire (Wang et al., 2001) (Yuan et Neufeld, 2001). La réponse inflammatoire due à une hypertension oculaire a été très peu étudiée dans les modèles expérimentaux de glaucome. En effet, au niveau de la rétine, quelques données existent quant à la réactivité gliale et aux voies d'activation engagées, mais au niveau des voies visuelles postérieures, seulement très peu d'éléments sont disponibles pour une meilleure compréhension des phénomènes inflammatoires. De plus, certaines données suggèrent que l'œil controlatéral à la lésion présenterait également une composante inflammatoire (Gallego et al., 2012) (Rojas et al., 2014). Le but de notre étude est de comprendre comment des éléments clés de l'inflammation pourraient être retrouvés dans l'œil controlatéral. Afin d'appréhender cette question, nous avons analysé les conséquences de l'hypertension oculaire unilatérale dans un modèle expérimental de rat par cautérisation des veines épisclérales. Nous avons examiné le niveau de l'inflammation dans tous les tissus des voies visuelles, y compris la rétine, le nerf optique et le colliculus supérieur (CS) des yeux des animaux hypertendus et contrôles. Afin d'apprécier comment l'information neuro-inflammatoire est transmise du CS à l'œil droit et à l'œil gauche, nous avons développé un nouveau modèle original. Ce modèle consiste en l'injection stéréotaxique de TNF $\alpha$  dans le CS droit afin d'explorer la réaction inflammatoire induite par le TNF $\alpha$  dans les différents tissus des voies visuelles incluant les deux SC et les yeux gauches et droits.

Ce travail novateur nous permet de confirmer que, dans un modèle expérimental de glaucome par cautérisation des veines épisclérales, une réactivité microgliale a bien lieu en périphérie de la rétine (Figure 2 de l'article). Nous observons également une gliose

astrocytaire dans la rétine des animaux glaucomateux. L'analyse de l'expression génique de gènes pro-inflammatoires que nous avons pratiqué, confirme ces résultats avec la mise en évidence d'une réaction inflammatoire exacerbée. La réactivité gliale et l'inflammation sont transmises au nerf optique (Figure 3) puis jusqu'à la cible principale des CGR dans le cerveau des rongeurs, le CS (Figure 4 et 5). Ces observations sont visibles dans les CS ipsi- et controlatéral de l'œil cautérisé. Nous montrons également que l'hypertension oculaire induit l'activation du marqueur c-fos dans les neurones du CS ainsi que l'activation de la voie des MAP kinases p-38 (Figure 6).

De plus, nous avons émis l'hypothèse que le CS était la structure par laquelle l'inflammation était transmise à l'œil controlatéral. Afin d'étayer notre hypothèse, nous avons effectué une injection de la toxine CTB (cholera toxin subunit B) dans le CS droit de rats naïfs. Nous avons tout d'abord jaugé la qualité et la profondeur de l'injection car les synapses des CGR sont localisées principalement dans les couches superficielles du CS. La CTB est bien retrouvée exclusivement dans le CS droit, dans le tractus optique droit et majoritairement dans la rétine gauche (Figure 7). En effet, chez le rongeur, le CS droit reçoit une majorité de fibres des CGR de l'œil controlatéral. Nous avons ensuite injecté le TNF $\alpha$  dans le CS droit d'animaux naïfs, puis évalué la fonction visuelle de ces rats en étudiant leurs réponses optomotrices à 5, 7, 9 et 15 jours après l'injection du TNF $\alpha$  (Figure 8). Nous mettons en évidence que la fonction visuelle de ces rats est altérée à partir de 7 jours jusqu'à 15 jours après l'injection. L'analyse de l'expression de gènes pro-inflammatoires (GFAP, CD68 et IL-1 $\beta$ ) montre que le TNF $\alpha$  induit une surexpression de ces gènes dans le CS droit mais également dans le CS gauche. Nos analyses d'immunofluorescence confirment ces données (Figure 8). L'analyse par immunofluorescence et par RT-qPCR montre que les yeux gauches et droits des animaux injectés au TNF $\alpha$  présentent une astrogliose, une activation des macrophages tissulaires associée à une inflammation (Figure 9).

L'ensemble de nos résultats démontre qu'une PIO élevée induit une neuro-inflammation dans la rétine de l'œil dont les veines ont été cautérisées. Cette inflammation est fortement associée à la dégénérescence des CGR. De plus, nous avons observé une activation des cellules gliales dans les deux CS qui pourrait en retour activer les terminaisons nerveuses des CGR par la production d'une large gamme de molécules inflammatoires. Le stress neuronal dans les CS va ensuite mener à une réponse inflammatoire dans la rétine de l'œil controlatéral. L'ensemble de nos données met en évidence le rôle complexe du CS dans la propagation de la neuro-inflammation induite par le glaucome et fournisse de nouvelles données quant à la propagation de la maladie.





## II Article

### Bilateral neuroinflammatory processes in visual pathways induced by unilateral ocular hypertension in the rat

Anaïs Sapienza<sup>1,2,3</sup>, Anne-Laure Raveu<sup>1,2,3</sup>, Elodie Reboussin<sup>1,2,3</sup>, Christophe Roubeix<sup>1,2,3</sup>, Céline Boucher<sup>1,2,3</sup>, Julie Degardin<sup>1,2,3</sup>, Annabelle Reaux-Le Goazigo<sup>1,2,3</sup>, Christophe Baudouin<sup>1,2,3,4,5,6</sup>, Stéphane Melik Parsadaniantz<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> INSERM, U968, Paris, F-75012, France

<sup>2</sup> UPMC Univ Paris 06, UMR\_S 968, Institut de la Vision, Paris, F-75012, France

<sup>3</sup> CNRS, UMR\_7210, Paris, F-75012, France

<sup>4</sup> Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts, INSERM-DHOS CIC 1423, Paris, F-75012, France

<sup>5</sup> Hop Ambroise Pare, AP HP, Dept Ophthalmology, F-92100, Boulogne, France

<sup>6</sup> Univ Versailles St Quentin En Yvelines, F-78180 Montigny-Le-Bretonneux

#### **Corresponding author:**

Dr. Stéphane Melik Parsadaniantz

Institut de la Vision,

17 rue Moreau, 75012 Paris, France.

E-mail address: stephane.melik-parsadaniantz@inserm.fr (S. Melik Parsadaniantz).

#### **Key words:**

Ocular hypertension

Neuronal degeneration

Neuroinflammation

Tissue macrophage activation

Superior colliculi

Visual deficiency

## Abstract

**Background:** Glaucoma is one of the leading causes of irreversible blindness in the world. The major risk factor is elevated intraocular pressure (IOP) leading to progressive retinal ganglion cell (RGC) death from the optic nerve (ON) to visual pathways in the brain. Glaucoma has been reported to share mechanisms with neurodegenerative disorders. We therefore hypothesize that neuroinflammatory mechanisms in central visual pathways may contribute to the spread of glaucoma disease. The aim of the present study was to analyze the neuroinflammation processes that occur from the pathological retina to the superior colliculi (SCs) in a rat model of unilateral ocular hypertension induced by episcleral vein cauterization (EVC).

**Findings:** Six weeks after unilateral (right) EVC in male Long-Evans rats, we evaluated both the neurodegenerative process and the neuroinflammatory state in visual pathway tissues. RGCs immunolabeled (Brn3a<sup>+</sup>) in ipsilateral whole flat-mounted retina demonstrated peripheral RGC loss associated with tissue macrophage/microglia activation (CD68<sup>+</sup>). Gene expression analysis of hypertensive and normotensive retinas revealed a significant increase of pro-inflammatory genes such as CCL2, IL-1 $\beta$  and Nox2 mRNA expression compared to naïve eyes. Importantly, we found an up-regulation of pro-inflammatory markers such as IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  and astrocyte and tissue macrophage/microglia activation in hypertensive and normotensive RGC projection sites in the SCs compared to a naïve SC. To understand how neuroinflammation in the hypertensive retina is sufficient to damage both right and left SCs and the normotensive retina, we used an inflammatory model consisting in a unilateral stereotaxic injection of TNF $\alpha$  (25 ng/ $\mu$ l) in the right SC of naïve rats. Two weeks after TNF $\alpha$  injection, using an optomotor test we observed that rats had visual deficiency in both eyes. Furthermore, both SCs showed an up-regulation of genes and proteins for astrocytes, microglia and pro-inflammatory genes, notably IL-1 $\beta$ . In addition, both retinas exhibited a significant increase of inflammatory markers compared to a naïve retina.

**Conclusions:** All these data evidence the complex role played by the SCs in the propagation of neuroinflammatory events induced by unilateral ocular hypertension and provide a new insight into the spread of neurodegenerative diseases such as glaucoma.

## Introduction

Glaucoma is the second leading cause of irreversible blindness and is projected to affect 80 million people worldwide by 2020, including at least 7 million people who will become bilaterally blind [1]. Glaucoma is a chronic degenerative optic neuropathy in which intraocular pressure (IOP) is abnormally elevated, leading to the progressive loss of retinal ganglion cells (RGCs) and an alteration of their axons. Today, high IOP is the major risk factor and the current treatment strategy focuses on its ability to reduce IOP by pharmacological or surgical means [2][3]. However, other mechanisms than IOP increase seem to be involved in the development and progression of this degenerative disease. Indeed, glaucoma progression can be observed in 15–25% of patients despite appropriate IOP control [4][5], and normal-tension glaucoma comprises a significant proportion of glaucoma cases in which IOP cannot explain neurodegeneration. In addition, abnormal activation of autoimmunity has been observed, which could induce the loss of RGCs in glaucoma patients without elevated IOP [6]. Consequently, this disease may progress through an IOP-independent mechanism and may involve other factors. In this way, numerous data indicate that inflammatory responses in the retina could appear earlier than the IOP rise [7] [8] [9] [10]. In DBA/2J mouse glaucoma model, it has been reported that young mice present microglial activation in their retina and optic nerve in absence of an elevated IOP context [11][12]. In addition, it has been suggested that astrocytes and Müller cells exhibit an activated phenotype with morphologic changes in retina before the increase of IOP. However, inflammatory events induced by glaucoma occur not only in the retina and the optic nerve (ON). In the human brain, it has been clearly observed that neurodegenerative processes also affect all layers of the lateral geniculate nucleus (LGN), which constitutes the major target of RGCs (corresponding to up to 80–90% of RGC fibers) [13][14]. In contrast to humans, in the rodent visual system, after decussating, the majority of RGC axons (90%) project directly to the contralateral superior colliculus (SC) [15] [16] [17]. Thus, in a rat model of acute intraocular hypertension, a strong astrogliosis has been shown in the SC contralateral to the hypertensive eye [18]. Moreover, it has been recently demonstrated that a deregulation of cytokine signaling in the SC can appear before the IOP or axonal degeneration in the DBA/2J mouse glaucoma model [19].

The normotensive eye could also be affected by these inflammatory changes. It has been observed that microglia and astrocyte reactivity is up-regulated in the retina contralateral to the hypertensive eye in mice [20] [21]. However, the pathophysiology of neuroinflammatory

events, responsible for contralateral eye alteration, remains to be clarified. Nevertheless, some data have provided evidence of RGC axon projection from one retina to the other via the optic chiasm and called retino-retinal projection pathway [22] [23]. However, this bypass pathway remains minor and concerns only a marginal proportion of axons [24] [23]. The SC could be the major structure of communication by which neuroinflammatory events could spread to both eyes. In rodents, after the optic chiasm each SC receives RGC axonal projections from both retinas in a proportion of around 85/15% [25][22] [26] [15] [16] [17].

The purpose of this study was to understand how neuroinflammatory processes could spread to the normotensive eye in the unilateral ocular hypertension glaucoma model. To respond to this question, we first analyzed the neuroinflammatory consequences of unilateral ocular hypertension in visual pathway tissues including retinas, optic nerves and SCs in both episcleral vein cauterization (EVC) and contralateral tissues. Then to demonstrate the role played by the SCs in the propagation of neuroinflammatory events induced by glaucoma, we used a model of unilateral injection of TNF $\alpha$  into the right SC.

## **Materials and Methods**

### **Animal model**

Fifty male 7-week-old Long-Evans rats (Janvier Labs) weighing 300–350 g were used. Animals were kept in pathogen-free conditions with food and water available ad libitum and housed in a 12-h light/12-h dark cycle.

All experiments were conducted after evaluation and approval by the Institutional Animal Care and Use Committee, Comité d'éthique pour l'expérimentation animale Charles Darwin (reference number: 03858.02), in accordance with the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes.

### **Induction of ocular hypertension and IOP measurements**

The surgical ocular hypertension (OHT) model was induced in the right eye of each rat by cauterization of three episcleral veins after conjunctival dissection under general anesthesia (intraperitoneal injection of ketamine (75 mg/kg, Virbac, Vauvert, France) and xylazine (10 mg/kg, Bayer HealthCare, Whippany, USA) as previously described [27] [28]. Briefly, the deep superior, temporal and inferior episcleral veins were located and cauterized using a standard disposable ophthalmic cautery. The left eyes were used as contralateral controls and eyes from naïve animals were used as naïve controls. At baseline and after the surgery, the animals were maintained for a 6-week period and monitored for IOP once a week using a handheld tonometer (TonoLab, Medtronic, Jacksonville, USA) without sedation. Animals

presenting low or instable IOP were then excluded.

### **Stereotaxic CTB/TNF $\alpha$ injection**

Fourteen male Long-Evans rats (7 weeks old) were deeply anesthetized with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and placed on a digital stereotaxic frame. A small drop of ophthalmic gel was placed on both eyes to prevent corneal dehydration throughout the procedure. The scalp was removed and the skull was exposed. A small craniotomy (1 mm  $\times$  1 mm<sup>2</sup>) was drilled above the SC in the right hemisphere (mediolateral, 1.6 mm; anteroposterior; -6.72 mm; dorsoventral, -4.2 mm from the bregma). Four microliters of sterile recombinant rat TNF $\alpha$  (25 ng/ $\mu$ l) (Biorad Laboratories, Nazareth, Belgium) or cholera toxin subunit B (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) Alexa 594 (Life Technologies, Paisley, UK) was unilaterally injected into the SC (1.2  $\mu$ l/min). After injection, the needle was left for 5 min and removed slowly. The skull skin was stitched and to recover, rats were placed for 1 h at 30°C. The tissue was analyzed 2 weeks after TNF $\alpha$  injection and 5 days after CTB injection.

### **Optomotor response**

The optokinetic tracking threshold was measured, under photopic conditions, by observing the optomotor responses of rats to rotating sinusoidal gratings (OptoMotry, CerebralMechanics, Alberta, Canada). Rats reflexively respond to rotating vertical gratings by moving their head in the direction of the grating rotation [29]. The protocol yields independent measures of right and left eye acuity based on the unequal sensitivity of the two eyes to pattern rotation: the right and left eyes are most sensitive to counter-clockwise and clockwise rotations, respectively. Once the rat became accustomed to the pedestal, the test was initiated by presenting the rat with a sinusoidal striped pattern that rotates either clockwise or counter-clockwise and varied widths. The software randomly increased spatial frequency of the grating until the animal no longer responded. The process of changing the spatial frequency of the test grating was repeated a few times until the highest spatial frequency the rat could track was identified, which defines the optokinetic tracking threshold under the experimental conditions. Experiments were conducted once independently before TNF $\alpha$  administration by two observers masked to the animal's treatment and previously recorded thresholds.

### **Immunohistochemistry**

#### *Tissue preparation*

At the end of the experiment, rats from each group were deeply anesthetized via a single IP injection of ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and fixed by a 50 ml intraaortic perfusion of 0.9% NaCl solution then 400 ml of 4% paraformaldehyde in 1x phosphate buffer saline (PBS; pH 7.4). After fixation, eyes were carefully removed and post-fixed for 1 h, then

rinsed in 1x PBS solution. The ONs and brains were post-fixed for 24 h and only ONs were cryoprotected for 24 h by immersion in a 1x PBS solution containing 30% sucrose at 4°C. Then the ONs were included in a 7.5% gelatin, 10% sucrose mix and frozen at -20°C. Retinal tissues were dissected intact from the globe and flat-mounted.

#### *Dual immunofluorescence labeling in whole flat-mounted retina*

The retinas were incubated for 2 h in a blocking-permeabilizing solution of 1x PBS containing 10% bovine serum albumin (BSA), Triton X-100 2% and Tween20 0.5%. The retinas were incubated for 4 days at 4°C with monoclonal mouse anti-Brn-3a (1/100, Merck Millipore, Darmstadt, Germany), polyclonal goat anti-Iba1 (1/400, Abcam, Cambridge, UK) or monoclonal mouse anti-CD68 (1/400, AbD Serotec, Oxford, UK), washed with 1x PBS six times for 20 min and incubated with donkey anti-mouse conjugated with Alexa Fluor 594 (Life Technologies) as the secondary antibody. The nuclei were stained with Dapi (1/2000) for 1 h and the retinal sections were mounted with Fluoromount (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

#### *Dual immunofluorescence labeling for retinas, ON and brain sections*

Free-floating brain sections (thickness, 30 µm) were cut with a vibratome (Leica, VT1000S) and collected in 1x PBS. The retina and ON sections (thickness, 10 µm) were cut with a cryostat (Leica, CM3050S) and kept at -20°C. The sections were washed several times in 1x PBS, blocked and permeabilized with 4% BSA, 4% normal horse serum (NHS) and 0.3% Triton X-100 in 1x PBS for 2 h.

Sections were subsequently incubated overnight at 4°C in 1x PBS containing 2% BSA, 2% NHS and 0.15% Triton X-100 with the following primary antibodies: polyclonal goat anti-Iba1 (1/400, Abcam), monoclonal mouse anti-GFAP (Glial fibrillary acidic protein) (1/500, Sigma-Aldrich), monoclonal mouse anti-CD68 (1/200, AbDserotec), polyclonal rabbit anti-CCL2 (1/500, Torrey-Pines), polyclonal rabbit anti-c-fos (1/500, Santa Cruz, CA), monoclonal mouse anti-NeuN (1/500, Merck Millipore) and rabbit anti-p-p38 (1/200, Cell Signaling Technology, Beverly, MA).

Secondary antibodies included donkey anti-mouse and anti-goat antibodies conjugated with Alexa Fluor 488 and 594 (1/500, Life Technologies) and biotinylated horse anti-rabbit antibodies (1/500, Vector Labs, Burlingame, USA) followed by a streptavidin Alexa Fluor 488 and 594 conjugate (1/500, Life Technologies). Staining with Dapi (1/2000), a nuclear marker, was also used. Sections were then washed, mounted on gelatin-coated glass slides, and coverslipped with Fluoromount. Control sections were processed in parallel in the absence of either primary or secondary antibodies.

### *Immunohistochemistry*

Free-floating sections were incubated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 20 min and then with blocked and permeabilized buffer (see previous section). Sections were incubated overnight at 4°C (in 1x PBS containing 2% BSA, 2% NHS and 0.15% Triton X-100) with GFAP and Iba1 antibodies. The sections were incubated with biotinylated goat anti-mouse and horse anti-goat antibodies (1/500, Vector Labs) for 1 h and the Vectastain ABC kit (1/250, Vector Labs) for 1 h. The color reaction was developed for 3–5 min with DAB<sup>+</sup> (Sigma-Aldrich). The sections were washed in 0.05 Tris buffer, pH 7.6, dehydrated in Safesolv (no toxic xylene substitute, VWR Q Path, Leighton Buzzard, UK) and coverslipped with Eukitt mounting media.

### *Data analysis*

Images were captured with a DM6000 microscope (Leica, Nanterre, France) and analyzed using MetaMorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). For labeling density analysis, image files were inverted and opened in gray-scale. Subsequently, using the thresholding function of Fiji to discriminate objects of interest from the surrounding background, the total surface occupied by immunoreactive structures (*i.e.* total stained pixels) above this set threshold was estimated within a standard area (ROI manager). The resulting values were expressed in arbitrary units. The results were expressed as the mean ± SEM of six to eight values per structure and per animal.

Images for co-localization were taken with an Olympus FV1000 laser-scanning confocal microscope (Olympus, Philadelphia, USA) and acquisitions were obtained using the Olympus Fluoview software version 4.1.

### **RGCs and activated tissue macrophage/microglia labeling and counting**

Eight microscopic images were captured using a ×20 objective in the peripheral retina and then peripheral, middle and central regions in whole flat-mounted retina labeled with Brn-3a and CD68 (which plays a role in phagocytic activities of tissue macrophages) antibodies, respectively. Images were captured with a DM6000 microscope (Leica) and automatic enumeration of RGC nuclei was assessed in a blind manner with MetaMorph software (MolecularDevices). Iba1- and CD68-positive cells were counted with the Fiji cell-counter plugin (ImageJ software, NIH, Bethesda, MD, USA) [30]. The Iba1- and CD68-positive cells in the central retina were quantified around the ON head.

### **mRNA extraction, reverse transcription and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)**

#### *Tissue preparation*

At the end of the experiment, rats from each group were deeply anesthetized using a single IP injection of ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and flushed with an intraaortic perfusion of 0.9% NaCl. The eyes were carefully removed and dissected, and the retinas were frozen in dry ice. The rat brains were detached from the cranial box and directly frozen in carbonic ice. Then the brains were put in stainless steel coronal brain matrix (Harvard Apparatus) and 1-mm slices were taken and micro-dissected. Regions of interest (superior colliculi) were frozen in liquid nitrogen.

#### *mRNA extraction, reverse transcription and RT-PCR*

Total RNA levels in retinal tissues and brain punches were assessed using the NucleoSpin RNA II and NucleoSpin RNA XS Purification kit, respectively (Macherey-Nagel, Düren, Germany). RNA concentration was evaluated from absorbance measurements with NanoDrop (ND-1000 spectrophotometer, Wilmington, USA).

#### *RT-PCR*

First-strand cDNA synthesis (20  $\mu$ l reaction) was performed with a High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Life Technologies). Concentrations of each sample were adjusted to 5 ng/ $\mu$ l of cDNA. Real-time PCR amplification of each sample was performed in triplicate, on the 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Life Technologies). TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) were used for target genes: GFAP (Rn01460868\_m1), IL1 $\beta$  (Rn00580432\_m1), CCL2 (Rn00580555\_m1), Nox2 (Rn00576710\_m1), Nox4 (Rn00585380\_m1), TNF $\alpha$  (Rn01525859\_g1), CD68 (Rn01495634\_g1), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Rn01775763\_g1). Specific mRNA levels were calculated after normalization of the results for each sample with those for GAPDH mRNA. The data are presented as relative mRNA units with respect to control values.

#### **Statistical analysis**

All values are expressed as means  $\pm$  SEM.

IOP measurement was analyzed using two-way ANOVA for repeated measures followed by the Bonferroni post hoc test. RGC counting, RT-qPCR data, CD68-positive cells and c-fos counting were analyzed using one-way ANOVA, followed by the Tukey multiple comparisons post hoc test. ON and SC immunostaining levels of GFAP and Iba1 were analyzed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test. Statistical analyses were performed at the significance level of 0.05 with Prism 6 GraphPad software (San Diego, USA).



## Results

### **Ocular hypertension leads to RGC death in the cauterized eye and also affects the contralateral eye**

IOP was measured with a tonometer and followed once a week for 40 days. Immediately after the surgery, the cauterized animals showed elevated IOP, which was stable between 30 and 40 mmHg. Naïve and normotensive (NT) eyes showed sustained normal IOP at 20 mmHg (Fig. 1A). Six weeks after cauterization, the animals were sacrificed and whole flat-mounted retina immunolabeling of RGCs was performed. All experiments were done at this time point. The images represent peripheral areas of naïve, NT and hypertensive (HT) eye retinas (Fig. 1B). First, we observed that RGC density differed between naïve and HT eyes. Indeed, the HT group exhibited a significant 22% decrease ( $p=0.0184$ ) in RGC density in peripheral retina compared to the naïve group (Fig. 1C). Moreover, there was a trend to the decrease in RGC density in the NT group. Indeed, we found an 8% nonsignificant decrease compared to the naïve group. Ocular hypertension induced RGC degeneration in peripheral retina 6 weeks after cauterization.

### **Ocular hypertension induces retinal inflammation and tissue macrophage activation in HT and NT eyes**

An earlier study showed that in a unilateral laser-induced OHT, the NT eye is also altered [20]. We aimed to explore and further detail this new data in our experimental model of OHT. In all experiments, we compared EVC and contralateral structures to naïve structures. EVC resulted in astrocyte activation (GFAP,  $p=0.0007$  with respect to naïve rats), in tissue macrophage activation (CD68,  $p=0.0309$  with respect to naïve rats) (Fig. 2A). There were also higher levels of mRNA for several key proinflammatory and oxidative stress factors: IL-1 $\beta$  ( $p<0.0001$ ), CCL2 ( $p=0.0015$ ) and Nox2 ( $p=0.0023$ ) in HT eye (Fig. 2B). For some genes, we found an increase in mRNA levels in the NT eye: GFAP ( $p=0.0150$ ) and IL-1 ( $p=0.0132$ ). We found tissue macrophage activation in the HT eye retina and a trend toward an increase in the NT eye retina. To investigate this increase in mRNA levels in CD68 due to tissue macrophage/microglia activation, whole flat-mounted retina double immunohistofluorescence of Iba1 and CD68 was performed. Pictures represent peripheral areas of naïve, contralateral and EVC retinas (Fig. 2C). We observed a change of microglia morphology in HT and NT eye retinas, showing that microglia cells acquire a reactive profile with short or even absent processes and large soma called ameboid.

Quantification of Iba1<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> cells (tissue macrophages/microglia) in peripheral retina showed a twofold increase in contralateral eyes compared to naïve eyes and in HT eyes compared to NT eyes (Fig. 2D). We observed the same type of result in the middle retina but to a lesser extent (Fig. 2E). In the naïve eyes, the basal level of tissue macrophages/microglia appeared to be higher in the central retina than in the peripheral and middle retina. A significant increase was still found in the NT eyes compared to naïve eyes (Fig. 2F).

We also found a significant increase in the CCL2 mRNA level and in the number of tissue macrophages in HT eye retinas. Given that previous studies have assumed that CCL2 is strongly implicated in monocyte recruitment during inflammation [31], we further wished to determine which cells were expressing CCL2 in the present model.

### **Ocular hypertension induces greater CCL2 expression by astrocytes in HT and NT eye retinas**

We showed that OHT resulted in increased expression of CCL2 in HT eye retinas compared to naïve and NT eye retinas and in NT eye retinas compared to naïve retinas.

To define in which type of cells CCL2 was expressed, we double-stained the retinas with CCL2 and the specific marker of astrocyte and Müller cell GFAP. Confocal images showed that CCL2 was widely co-localized with these cells specifically in the RGC layer (Fig. 2G). Moreover, GFAP and CCL2 labeling revealed a significant increase in HT eye retina compared to naïve retina. These data suggest that CCL2 is probably released by astrocytes and Müller cells in both basal and injury conditions.

### **Retinal astrogliosis and microgliosis are transmitted along the ON**

Segments of the ONs were examined for GFAP and Iba1 expression by immunofluorescence (Fig. 3A). Quantitative analysis of the surface area covered by GFAP staining within the ON revealed almost a twofold increase in the HT eye group compared to the naïve eye group ( $p=0.0415$ ) (Fig. 3B). Surprisingly, the extent of Iba1 immunoreactivity in the NT eye group was at the same level as in the naïve eye group but showed a twofold increase in the HT eye group ( $p=0.0476$ ) (Fig. 3C).

### **Neuroinflammation in central visual projection pathways**

After decussating, ON fibers divide in two ways in the rodent brain. The minor synaptic relay that concerns only a small percentage of fibers is the LGN. The major ON fiber relay in the rat brain is the SC. We found a similar profile of inflammation in the retina (Fig. 4). EVC led to astrocyte and tissue macrophage activation (increase in GFAP and CD68 mRNA levels [ $p=0.0136$  and  $p=0.0018$ , respectively], with respect to naïve rats) (Fig. 4A). There were

higher levels of mRNA for proinflammatory and oxidative stress factors: IL-1 $\beta$  ( $p=0.0115$ ), TNF $\alpha$  ( $p=0.0134$ ) (Fig. 4B), Nox2 ( $p=0.0004$ ) and Nox4 ( $p<0.0001$ ) (Fig. 4C) in HT eye retinas. For some genes, we found an increase in mRNA levels in the NT eye: TNF $\alpha$  ( $p=0.0175$ ), CD68 ( $p=0.0291$ ), Nox2 ( $p=0.003$ ) and Nox4 ( $p=0.0105$ ).

To confirm these results, we performed immunocytochemistry in SCs. On the images of rat brain sections, SCs are circled in red (Fig. 5A). In naïve SCs, GFAP labeling was very rare and focused around the blood vessels and under the pia mater (Fig. 5B). In contralateral SCs, dense GFAP labeling was observed, indicating astrocyte activation. In contralateral SCs, microglia seemed to have a wider soma than in naïve SCs (Fig. 5B).

### **Ocular hypertension induces c-fos and phosphorylated/activated p38 (p-p38) activation in SC**

Naïve, ipsi- and contralateral SC sections were analyzed with immunofluorescence with c-fos and NeuN markers (Fig. 6A) and the number of neurons exhibiting the neuronal activation c-fos marker was counted (Fig. 6B). The quantitative analysis showed a twofold increase in the ipsilateral group compared to the naïve group ( $p=0.0385$ ) and nearly a threefold increase in the contralateral group compared to the naïve group ( $p=0.001$ ). These data suggested that retinal inflammation increased second-order neuron activation in ipsi and contralateral SCs compared to naïve SCs.

In the next series of experiments, we investigated the activation of the p-p38 pathway in the SCs (Fig. 6C). In naïve SCs, only a few cells were immune-positive for p-p38. In contrast, in ipsi- and contralateral SCs, p-p38 was exclusively detected in microglia and the positive cell distribution did not change between ipsi- and contralateral SCs. Quantification of p-p38-positive cells confirmed that this activation only occurred in ipsi- and contralateral SCs (Fig. 6D) ( $p<0.0001$ ).

### **HT eye inflammation is mostly transmitted to the NT eye via the SCs**

We hypothesized that the SC (the first relay in the rat visual system) is the structure by which inflammation can be transmitted to the contralateral eye. To verify this hypothesis, we injected the CTB Alexa 594 into the right SC of naïve rats. First, to test the quality of injection, we made a single injection of CTB in the right SC (Fig. 7B). We did not find CTB in the contralateral SC (Fig. 7A). Then the injection was localized in the superficial layers of the SC [32], with most of the CTB fluorescence (in red) located in the superficial SC (Fig. 7B). Five days after injection in the right SC, the CTB was found in the right optic tract nerve fibers (Fig. 7C). In rats the majority of fibers originating from the left retina project to the right SC. Indeed, we found a large number of RGCs containing the fluorescent tracer in the left retina (Fig. 7D), while in the right retina less stained RGCs were detected (Fig. 7E).

After validating the quality and depth of injection, we further injected TNF $\alpha$  (25 ng/ $\mu$ l) into the right SC of naïve rats. Figure 8A illustrates the rat visual pathway and the injection site. We observed whether or not RGC fibers decussate at the optic chiasm. We also assessed whether the treatment could impair rat visual function by studying their optomotor responses to rotating sinusoidal gratings 5, 7, 9 and 15 days after TNF $\alpha$  injection into the SC (Fig. 8B). These data indicate that the visual function of rats treated with TNF $\alpha$  was impaired from 7 days up to 15 days after injection ( $p=0.0446$  for the left eye versus the naïve eye and  $p=0.0211$  for the right eye versus the naïve eye at 7 days;  $p=0.0032$  for the left eye versus the naïve eye and  $p=0.0006$  for the right eye versus the naïve eye at 9 days;  $p=0.0025$  for the left eye versus the naïve eye and  $p=0.0146$  for the right eye versus the naïve eye at 15 days).

RT-qPCR analysis of pro-inflammatory genes confirmed our previous results. We observed a significant increase in GFAP mRNA for astrogliosis (Fig. 8C) ( $p<0.0001$ ) in CD68 mRNA for tissue macrophage/microglia activation (Fig. 8D) ( $p<0.0001$ ) and in IL-1 $\beta$  mRNA (Fig. 8E) ( $p<0.0001$ ) in the right SC compared to a naïve SC. Some genes were increased in the left SC, such as GFAP ( $p<0.0001$ ), CD68 ( $p=0.0044$ ) and IL-1 $\beta$  ( $p=0.0090$ ).

TNF $\alpha$  injection produced wide astrogliosis and tissue macrophage/microglia activation (Fig. 8F) in both left and right SCs. Quantification of the number of Iba1<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> cells showed an increase in the number of tissue macrophages/microglia in the left and right superficial SCs compared to a naïve SCs (Fig. 8G). We also observed an activation of the p-p38 pathway in microglia in the left and right SCs, while no p-p38-positive cells were seen in naïve SCs (Fig. 8F). Quantification of the number of Iba1<sup>+</sup>p-p38<sup>+</sup> cells confirmed these results (Fig. 8H).

To evidence damage in both eyes, we performed whole flat-mounted retina double immunohistochemistry for Iba1 and CD68. The images show areas of naïve, right and left retinas (Fig. 9A). We observed morphological changes of microglia in right and left retinas corresponding to activated tissue macrophages. Quantification of Iba1<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> cells (tissue macrophage/microglia activation) in retinas showed more than a twofold increase in right and left eyes compared to naïve eyes (Fig. 9B). To support these results, we performed RT-qPCR analysis in left and right retinas in TNF $\alpha$ -treated rats compared to naïve rats. We observed a significant increase of GFAP (Fig. 9C) ( $p<0.0001$  in the left retina and  $p=0.0074$  in the right retina compared to a naïve retina), CD68 (Fig. 9D) ( $p<0.0001$  in the left retina and  $p<0.0001$  in the right retina compared to a naïve retina) and IL-1 $\beta$  (Fig. 9F) ( $p=0.0006$  in the left retina and  $p=0.0005$  in the right retina compared to a naïve retina) mRNA in both retinas.

## Discussion

In this study, we used an experimental model of glaucoma (induced by EVC), which is very close to the human form of the disease. Numerous studies have characterized and used this EVC model, which matches specific glaucoma symptoms: IOP increase with a reduction of aqueous humor outflow, progressive RGC degeneration, aqueous humor TGF- $\beta$ 2 level increase, and trabecular cell death [3][4][33]. In this EVC glaucoma model, RGC loss is progressive (22% decrease in peripheral retina 6 weeks after cauterization). This peripheral RGC loss has also been observed in different glaucoma models with, however, a markedly different percentage of RGC loss. One study reports an 11% decrease of RGC density 12 weeks after intracameral microbead injection in mice [34], while another group showed a 30% decrease 4 months after an association of microbead injection and laser photocoagulation of the trabeculum meshwork in mice [35].

In neurodegenerative disease, a neuronal degeneration is almost always associated with inflammation. Therefore, in glaucomatous human eyes, an activated phenotype of astrocytes, Müller cells and microglia cells are found in retinal layers [36]. Indeed, the hallmarks of glial and microglial activation such as cellular body hypertrophy and increased expression of glial intermediate filaments (GFAP) and tissue macrophage/microglia marker such as CD68 are classically observed in glaucomatous eyes in humans [37] as well as in experimental models of OHT [38] [39] [21].

In this study, we demonstrated that the increase of the number of activated tissue macrophages/microglia in the HT eye retina is correlated with an increase in CCL2 mRNA. In addition, we observed that CCL2 chemokine is expressed by astrocytes. It is well known that CCL2 is strongly implicated in monocyte chemoattractivity from blood circulation to the inflammatory site [31]. Activated tissue macrophages could stem from either activation of resident microglia or activation of infiltrating monocytes. Tissue macrophage/microglia activation could be responsible for the increase in pro-inflammatory cytokines (TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) observed in retina [40]. This result is corroborated with a recent study that clearly demonstrated that pro-inflammatory mediators signal the progression of pathological changes in visual projection in a DBA/2J glaucoma model prior to functional transport loss and RGC death [19].

We hypothesized that loss of RGCs can lead to RGC axon impairments and ON gliosis. In this way we clearly observed a strong radial astrogliosis and tissue macrophage activation in the ON of the HT eye. These results are consistent with other studies that have examined glaucomatous ON. In a diode laser burn model, strong GFAP immunostaining was

found associated with a degeneration of ON fibers [41]. In a 12-month-old DBA/2J model, the authors are found lower  $\beta$ -Tubulin labeling than in the control mice [42]. This suggests an anterograde deficit transport that can lead to damage in SCs. In our experimental model of glaucoma, the SC is also injured. The contralateral SCs showed astrogliosis, microglia activation and elevated pro-inflammatory cytokine expression. In a model of acute perfusion of the anterior chamber of the right eye with saline solution, they found an increase in the number of GFAP-positive astrocytes throughout the superficial layers of the left SC [18]. In a model of laser photocoagulation of the perilimbal and episcleral veins, they found a significant enlargement of the GFAP within the contralateral SC and also in the ipsilateral SC [43].

Increasing evidence supports that the glaucomatous tissue stress (apoptosis of RGCs) initiated by inflammation involves reactive oxidative species (ROS) [44][45]. This study found an increase in an oxidative stress marker (Nox2) in HT eye retina. The Nox2 enzyme is implicated in ROS synthesis, particularly in superoxide ion production. This result is corroborated by the demonstration that in another experimental model in which glaucoma is induced by chronic injection of hyaluronic acid in the eye's anterior chamber, a decrease in superoxide dismutase and catalase activity was observed in total retina after 1 month [46]. Moreover, we found that oxidative stress markers, Nox2 and Nox4, were also significantly elevated in SCs. It is already known that oxidative stress by ROS overproduction may significantly contribute to neurodegeneration [47].

In the present study, we hypothesized that retinal inflammation in the HT eye could be transmitted to the NT eye via the SC (the main projection site of RGCs in rodents). Indeed, RGC axons from one retina project to both SCs with 10–15% RGC fibers coming from the ipsilateral eye and 85–90% from the contralateral eye [25][22] [26] [15] [16] [17]. In our unilateral glaucoma model, we observed an activation of second-order neurons and/or interneurons in both SCs. Indeed, there is a significant increase in the number of c-fos-positive cells in both SCs compared to naïve SCs. c-fos is a marker that could identify activated neurons in histological preparations. c-fos is a proto-oncogene that is expressed within neurons following voltage-gated calcium entry into the cell [48]. Neuronal excitation leads to a rapid and transient induction of c-fos. We demonstrated that c-fos is activated in contra- and ipsilateral SC after unilateral OHT. We postulated that neuroinflammation and RGC death induces activation of the second-order neurons in both SCs. The ipsilateral SC analysis revealed, in an original way, an injury with microglia activation and elevated pro-inflammatory cytokine expression. We hypothesized that the 10–15% of RGC fibers from the HT eye induce neuroinflammation in the ipsilateral SC.

We also found activation of the p-p38 pathway in microglia in both contra- and ipsilateral SC. It is already known that p-p38 immunostaining was found in glia of human

glaucomatous retina [36]. Moreover, p38 could be activated and phosphorylated by pro-inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  [49]. This observation is particularly true in our model because we found an increase in TNF $\alpha$  expression in both contra- and ipsilateral SC. p-p38 activation is also involved in apoptotic signaling, especially in RGCs [50]. We did not find any neuronal degeneration in SCs (no TUNEL-positive cells; data not shown). Nevertheless, our glaucoma model is chronic and there is only a peripheral part of RGC cell loss. We could postulate that the neuroinflammatory information is not strong enough to induce neuronal degeneration in SCs but sufficient to induce neuroinflammation in SCs.

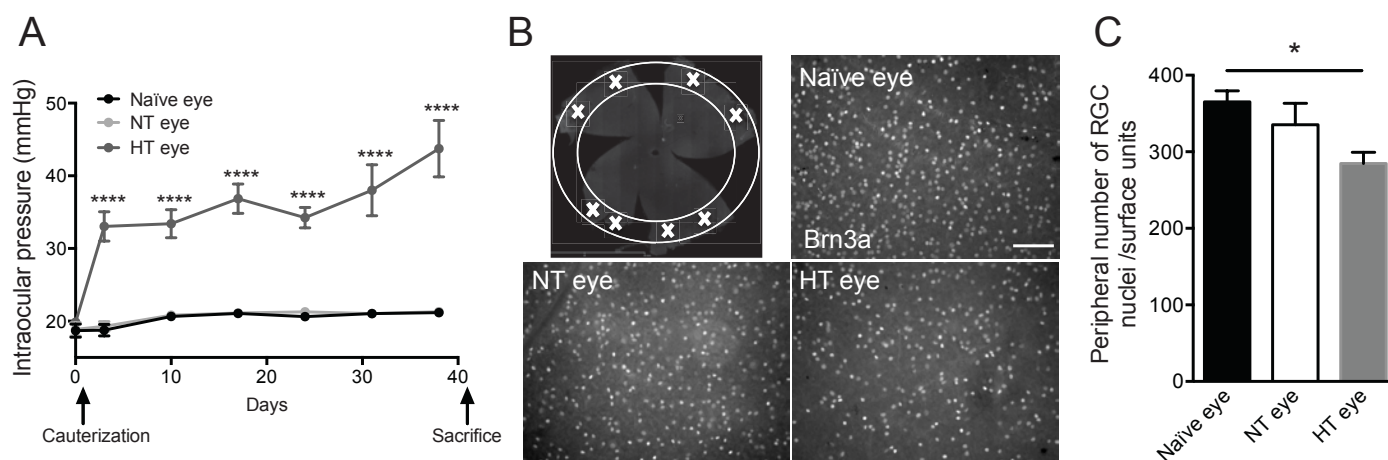
The NT eye analysis of EVC rats also displayed astrogliosis and tissue macrophage/microglia activation. A research group has already shown damage in the NT eye but only in the retina of OHT animals [20][21]. We wished to identify how this inflammation could be transmitted to the NT eye. In the present experimental model of OHT, the results clearly show that the widespread inflammation observed in the HT eye spread to the NT eye. We hypothesized that the SC is the major site of antero- and retrograde communication between the eyes. To test this hypothesis, we injected an inflammatory cytokine (TNF $\alpha$ ) into the right SC, which receives approximately 10–15% RGC fibers from the right eye and 85–90% RGC fibers from the left eye. Thus, we showed that after unilateral injection of TNF $\alpha$  into the right SC, both right and left SCs present astrogliosis and tissue macrophage/microglia activation. In addition, a significant increase in the number of activated tissue macrophages in both left and right eyes was associated with inflammation. These results contribute new information to the history of glaucoma development. Inflammation in one eye could activate RGC fibers and induce inflammation in both SCs, which in turn may activate inflammation in the other eye by retrograde transport by way of RGC fibers. To corroborate this hypothesis, RGCs have been traced from the SC using a neurotracer dye such as Fluorogold [51], which was preferentially concentrated in the cell body of RGCs during the next 3–4 days. Moreover, in a model of Parkinson disease, a retrograde degeneration of dopaminergic neurons was observed after 6-hydroxydopamine (6-OHDA) injection in the striatum, which receives substantia nigra dopaminergic neuronal fibers. Striatal fibers degenerate, followed by cellular bodies located in substantia nigra [52].

These results demonstrate that elevated IOP induces neuroinflammation in the retina of the damaged eye but not only at the RGC level. This inflammation is strongly associated with RGC degeneration and leads to stress signal transmission in both SCs by RGC axons. We observed glial cell activation in both SCs and it is well known that glial cells could activate neurons by production of a wide range of inflammatory molecules [53]. Damaged neurons of SCs will in turn induce neuroinflammation in the left retina that contains a cellular body of RGCs and whose RGC fibers project in both the left and right SCs. All of these data evidence the complex role of the SCs in the propagation of neuroinflammatory events

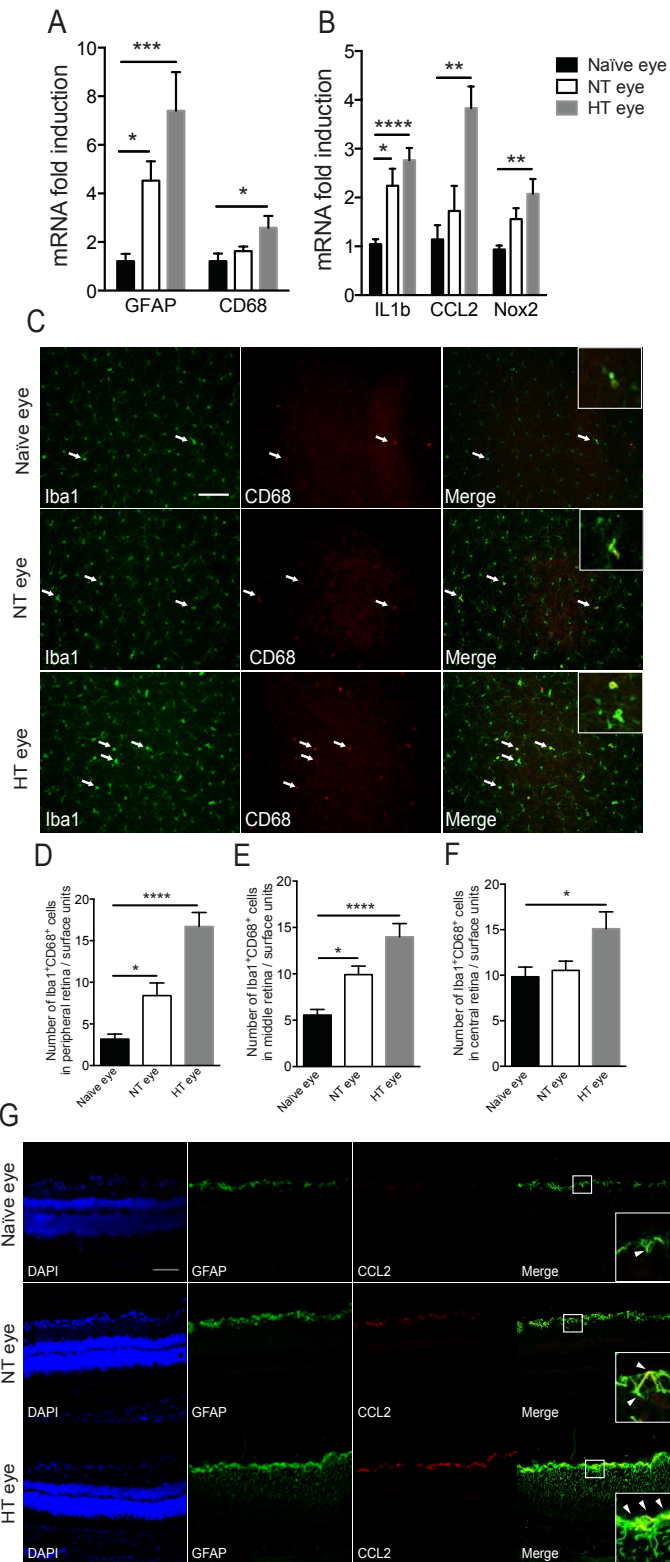
induced by glaucoma and provide new insight onto the development of neurodegenerative diseases such as glaucoma.



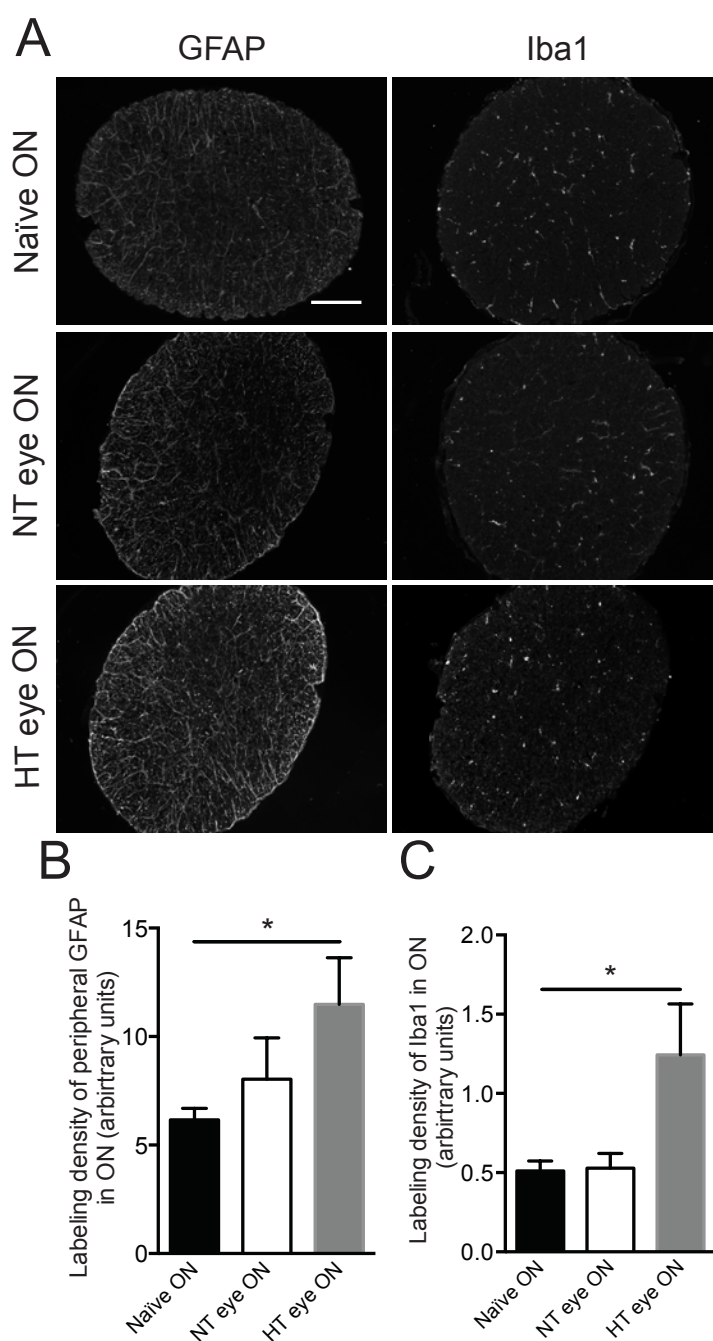
## Figures



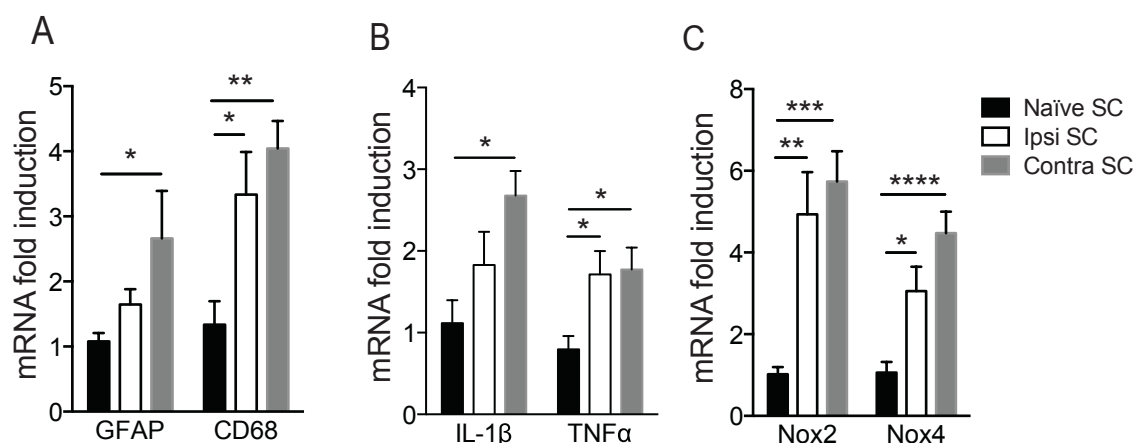
**Figure 1: Cauterization leads to an elevated IOP and RGCs death.** (A) IOP monitoring of HT right eye, NT eye and naïve eye over 40 days ( $n=8$  per group). (B) Peripheral area of whole flat-mounted retina marked with a white cross matching the region of interest. Whole flat-mounted retina immunolabeled with Brn3a antibody. Representative images of the peripheral area showing immunopositive staining of RGCs in a naïve eye, NT eye and HT eye. Scale bar= 100  $\mu\text{m}$ . (C) Quantification of peripheral RGC density per retina using automated nuclei counting in a naïve ( $n=7$ ), NT ( $n=6$ ) and HT eye ( $n=6$ ). Each density corresponds to an average of RGCs determined from eight peripheral images per retina. Data are expressed as means  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA for repeated measures followed by Bonferroni post-hoc test was used for IOP: \*\*\*\* $p<0.0001$  naïve and NT versus HT eyes. One-way ANOVA, followed by the Dunnett multiple comparisons test was used for RGC counting: \* $p<0.05$  naïve versus HT eyes.



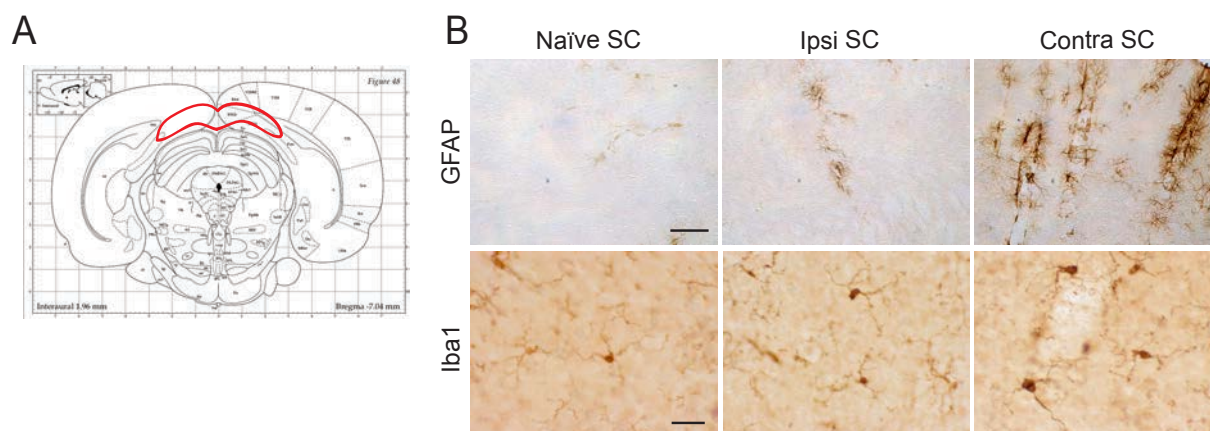
**Figure 2: EVC induces retinal inflammation and microglial activation in both HT and NT eyes.** (A, B) RT-qPCR analysis of the effect of cauterization on GFAP, CD68, IL-1 $\beta$ , CCL2 and Nox2 mRNA levels in naïve, NT and HT eye retinas. mRNA levels are presented as a fold change relative to naïve rats after normalization with respect to the housekeeping gene (GAPDH). Each bar is the mean  $\pm$  SEM.  $n=8-10$  animals/group. (C) Peripheral images from whole flat-mounted retina double-immunolabeled with Iba1 and CD68 antibody in naïve, NT and HT eyes. Arrows show colocalization between markers. Scale bar= 100  $\mu$ m. (C–E) Quantification of peripheral (D), middle (E) and central (F) mononuclear phagocyte (Iba1<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> cells) density per retina in the naïve ( $n=6$ ), NT ( $n=7$ ) and HT ( $n=7$ ) eye groups. The average mononuclear phagocyte density values were determined from eight peripheral, middle or central images per retina. (G) Confocal images of double-immunolabeling of CCL2 with GFAP, an astrocytic marker, in naïve, NT and HT eye retinas. Arrowheads in inset show colocalization between markers. Scale bar = 100  $\mu$ m. Results are expressed in arbitrary units and correspond to the means  $\pm$  SEM. We performed a one-way ANOVA followed by the Kruskal–Wallis multiple comparisons post-hoc test: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  and \*\*\*\* $p<0.0001$ .



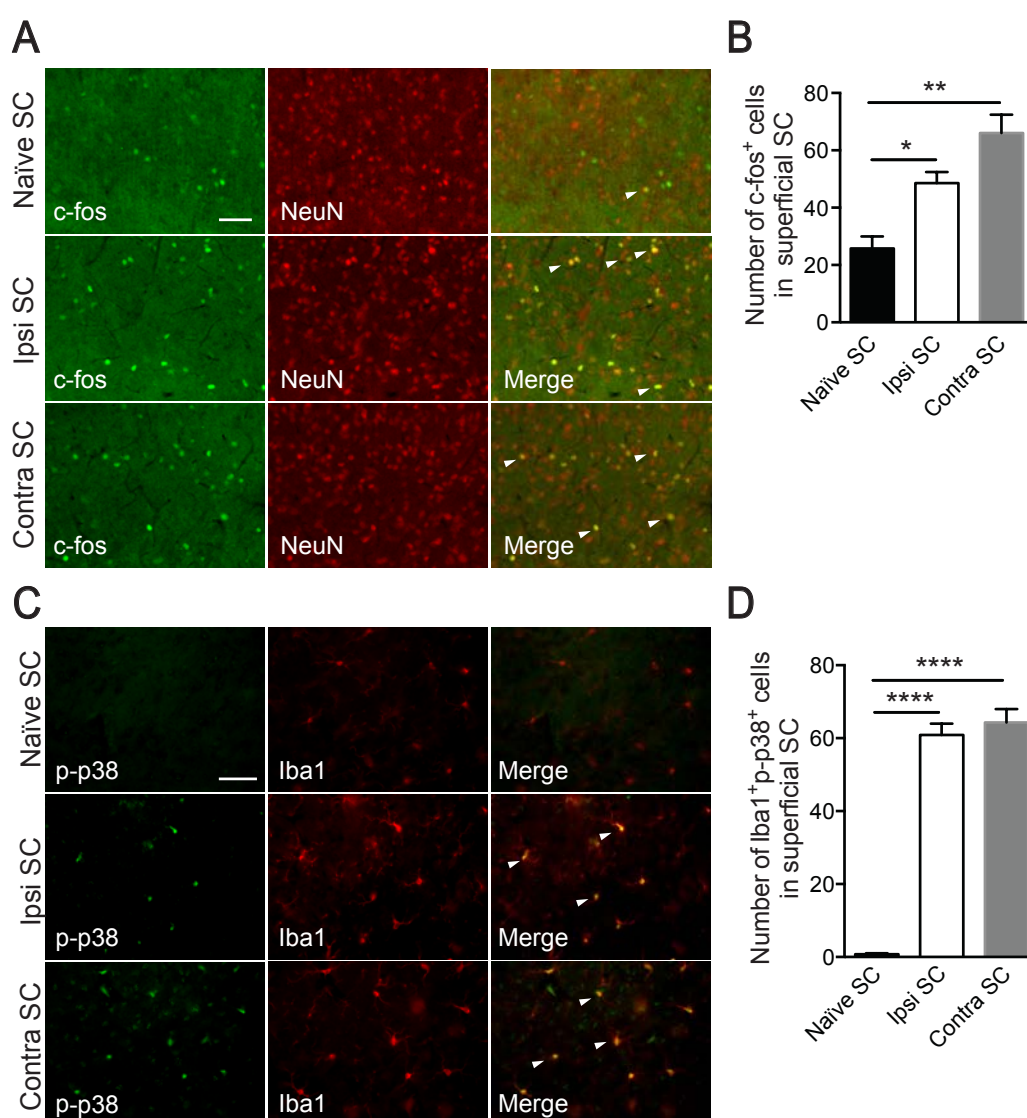
**Figure 3: EVC induces astrogliosis and microgliosis in ON.** (A) Immunofluorescent labeling for GFAP and Iba1 in naïve, NT and HT eye ON. Scale bar= 100  $\mu$ m. Quantification of GFAP (B) and Iba1 (C) immunofluorescence levels in naïve ( $n=6$ ), NT ( $n=7$ ) and HT ( $n=7$ ) eye ON. Results are expressed in arbitrary units and correspond to the means  $\pm$  SEM. We performed a one-way ANOVA followed by the Dunnett multiple comparisons post-hoc test:  $*p<0.05$ .



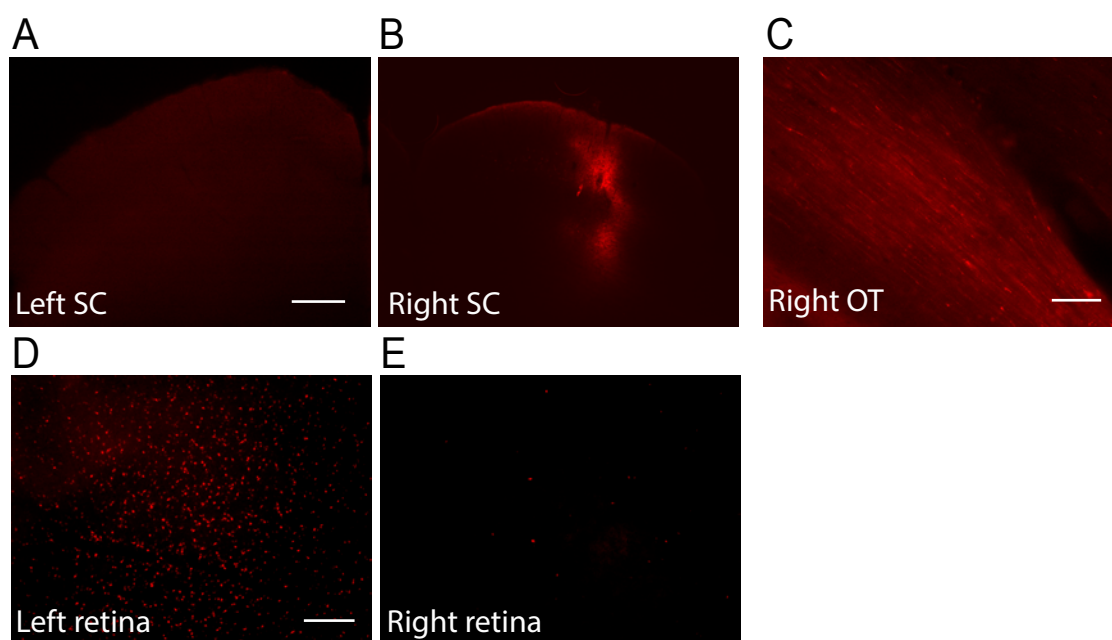
**Figure 4: EVC induces an increase of inflammatory markers at mRNA levels in ipsi- and contralateral SC.** RT-qPCR analysis for GFAP, CD68 (A), IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$  (B), Nox2 and Nox4 (C) mRNA levels in naïve, ipsi- and contralateral SCs. For each marker, mRNA levels are presented as a fold change relative to naïve rats after normalization with respect to the housekeeping gene (GAPDH). Each bar is the mean  $\pm$  SEM.  $n=8-10$  animals/group. We performed a one-way ANOVA followed by the Dunnett multiple comparisons post-hoc test for GFAP, IL-1 $\beta$ , Nox2 and Nox4 and the Kruskal–Wallis test for TNF- $\alpha$  and CD68: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  and \*\*\*\* $p<0.0001$ .



**Figure 5: EVC induces astrogliosis and microgliosis in ipsi- and contralateral SCs.** (A) Representative image of rat brain section showing the SC (circled in red). (B) GFAP and Iba1 staining in naïve, ipsi- and contralateral SCs. Scale bar = 100  $\mu$ m (GFAP) and 50  $\mu$ m (Iba1).

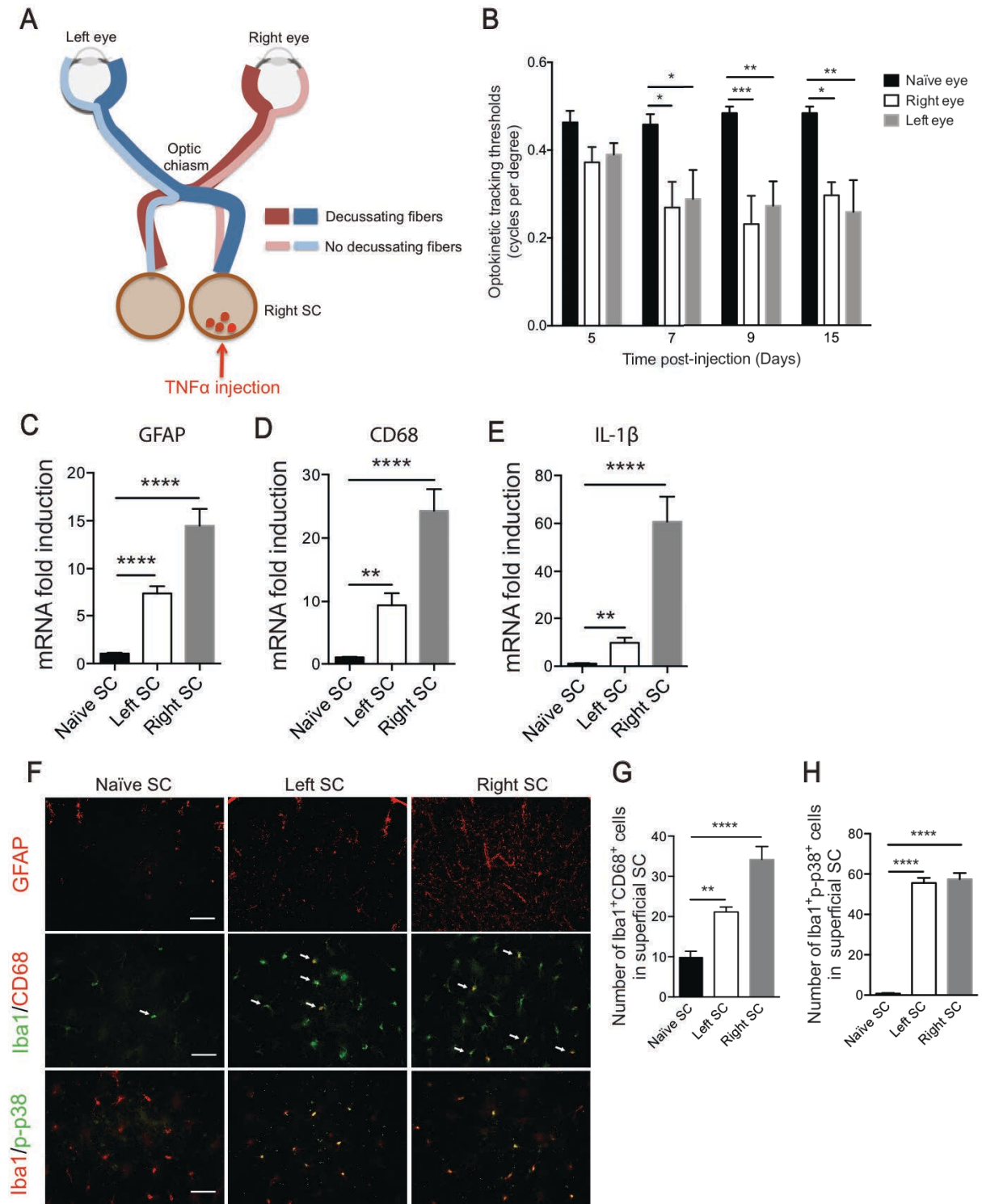


**Figure 6: EVC induces inflammation, c-fos and p-p38 pathway activation in ipsi- and contralateral SCs.** (A) Immunofluorescence of c-fos and NeuN in naïve, ipsi- and contralateral SCs. (B) Quantification of c-fos<sup>+</sup> cells in naïve ( $n=6$ ), ipsi- ( $n=7$ ) and contralateral ( $n=7$ ) in superficial SCs. (C) Double-immunofluorescent labeling p-p38/Iba1 in naïve, ipsi- and contralateral SCs. (D) Quantification of Iba1<sup>+</sup>p-p38<sup>+</sup> cells in naïve ( $n=6$ ), ipsi- ( $n=6$ ) and contralateral ( $n=6$ ) SCs. Scale bars = 200  $\mu$ m. Results are expressed in arbitrary units and correspond to the means  $\pm$  SEM. We performed a one-way ANOVA followed by the Dunnett multiple comparisons test: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  and \*\*\*\* $p<0.0001$ .

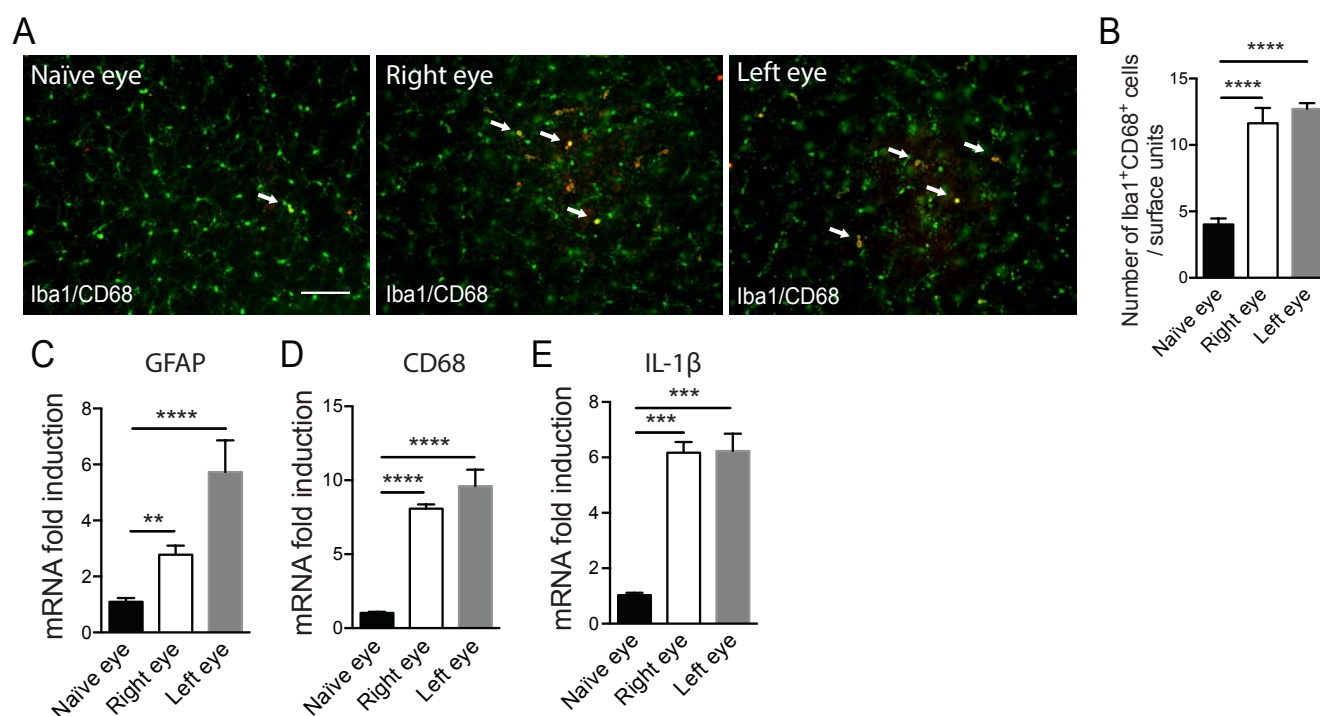


**Figure 7: Unilateral CTB injection in the right SC labels RGCs in both retinas.** (A) CTB Alexa 594 was stereotaxically injected into the right SC. No staining was observed in the left SC. (B) CTB in the right SC follows the needle path. Scale bar = 400  $\mu$ m. (C) Neuronal fibers containing the CTB tracer in the right optic tract (OT). Scale bar = 100  $\mu$ m (D) Numerous RGCs labeled with CTB in the left retina. (E) Only a few RGCs are labeled by CTB in the right retina. Scale bar = 200  $\mu$ m.





**Figure 8: Unilateral TNF  $\alpha$  injection induces visual defect, inflammation and p-p38 pathway activation in both SCs.** (A) Diagram showing the neuronal visual pathway in rodent. TNF  $\alpha$  (25 ng/ $\mu$ l) is injected into the right SC. (B) The optomotor set-up allowed the determination of the optokinetic tracking threshold measurements (cycles per degree) for the left and right eyes, independently scored (clockwise and counterclockwise responses, respectively) under photopic conditions. Right and left eye sensitivity for naïve ( $n=5$ ), left ( $n=6$ ) and right ( $n=6$ ) rats at 5, 7, 9 and 15 days after TNF  $\alpha$  injection. RT-qPCR analysis for GFAP (C), CD68 (D) and IL-1 $\beta$  (E) mRNA levels in naïve, left and right SCs. For each marker, mRNA levels are presented as a fold change relative to naïve rats after normalization with respect to the housekeeping gene (GAPDH). Each bar is the mean  $\pm$  SEM.  $n=8-10$  animals/group. Immunofluorescence of GFAP, Iba1/CD68 and Iba1/p-p38 (F) in naïve, left and right SCs. Arrows show colocalization between markers. Scale bar = 200  $\mu$ m (GFAP) and 50  $\mu$ m (Iba1/CD68 and Iba1/p-p38). Quantification of Iba1<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> cells (G) and Iba1+p-p38<sup>+</sup> cells (H) in naïve ( $n=5$ ), left ( $n=6$ ) and right ( $n=6$ ) SCs. Results are expressed in arbitrary units and correspond to the means  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA for repeated measures followed by Bonferroni post-hoc test was used for optomotor responses: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , and \*\*\* $p<0.001$  naïve, right and left eyes. We performed a one-way ANOVA followed by the Dunnett multiple comparisons test: \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  and \*\*\*\* $p<0.0001$  and the Kruskal–Wallis test for IL-1 $\beta$ .



**Figure 9: SC inflammation induces inflammation in both retinas.** (A) Whole flat-mounted retina double-immunolabeled with Iba1 and CD68 in naïve, right and left eyes of TNF  $\alpha$  - injected rats. Arrows show colocalization between markers. Scale bar = 100  $\mu$ m. (B) Quantification of Iba1+CD68+ cells per retina in the naïve group ( $n=6$ ), right eye ( $n=6$ ) and left eye ( $n=6$ ) groups. RT-qPCR analysis for GFAP (C), CD68 (D) and IL-1 $\beta$  (E) mRNA levels in naïve, left and right retinas. For each marker, mRNA levels are presented as a fold change relative to naïve rats after normalization with respect to the housekeeping gene (GAPDH). Each bar is the mean  $\pm$  SEM.  $n=8-10$  animals/group. Results are expressed in arbitrary units and correspond to the means  $\pm$  SEM. We performed a one-way ANOVA followed by the Dunnett multiple comparisons test: \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  and \*\*\*\* $p<0.0001$  and the Kruskal–Wallis test for GFAP, and IL-1 $\beta$ .

## References

1. Quigley H a, Broman a T: **The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020.** *Br J Ophthalmol* 2006, **90**:262–7.
2. Wallace A: **Medical management of glaucoma.** *N Engl J Med* 1998, **339**.
3. Weinreb RN, Friedman DS, Fechtner RD, Cioffi G a, Coleman AL, Girkin C a, Liebmann JM, Singh K, Wilson MR, Wilson R, Kannel WB: **Risk assessment in the management of patients with ocular hypertension.** *Am J Ophthalmol* 2004, **138**:458–67.
4. Caprioli J: **Neuroprotection of the optic nerve in glaucoma.** 1997.
5. Gupta N, Yücel YH: **Should we treat the brain in glaucoma?** *Can J Ophthalmol* 2007:409–413.
6. Wax MB, Tezel G, Yang J, Peng G, Patil R V, Agarwal N, Sappington RM, Calkins DJ: **Induced autoimmunity to heat shock proteins elicits glaucomatous loss of retinal ganglion cell neurons via activated T-cell-derived fas-ligand.** *J Neurosci* 2008, **28**:12085–96.
7. Soto I, Howell GR: **The complex role of neuroinflammation in glaucoma.** *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014, **4**.
8. Tezel G: **Immune regulation toward immunomodulation for neuroprotection in glaucoma.** *Curr Opin Pharmacol* 2013, **13**:23–31.
9. Howell GR, Soto I, Zhu X, Ryan M, Macalinao DG, Sousa GL, Caddle LB, Macnicoll KH, Barbay JM, Porciatti V, Anderson MG, Smith RS, Clark AF, Libby RT, John SWM: **Radiation treatment inhibits monocyte entry into the optic nerve head and prevents neuronal damage in a mouse model of glaucoma.** *J Clin Invest* 2012, **122**.
10. Nickells RW, Howell GR, Soto I, John SWM: **Under pressure: cellular and molecular responses during glaucoma, a common neurodegeneration with axonopathy.** *Annu Rev Neurosci* 2012, **35**:153–79.

11. Bosco A, Inman DM, Steele MR, Wu G, Soto I, Marsh-Armstrong N, Hubbard WC, Calkins DJ, Horner PJ, Vetter ML: **Reduced retina microglial activation and improved optic nerve integrity with minocycline treatment in the DBA/2J mouse model of glaucoma.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008, **49**:1437–46.
12. Bosco A, Steele MR, Vetter ML: **Early microglia activation in a mouse model of chronic glaucoma.** *J Comp Neurol* 2011, **519**:599–620.
13. Gupta N, Ang L-C, Noël de Tilly L, Bidaisee L, Yücel YH: **Human glaucoma and neural degeneration in intracranial optic nerve, lateral geniculate nucleus, and visual cortex.** *Br J Ophthalmol* 2006, **90**:674–8.
14. Gupta N, Yücel YH: **Glaucoma as a neurodegenerative disease.** *Curr Opin Ophthalmol* 2007, **113**:1120–5.
15. Forrester J and P: **Nerve fibres in optic nerve in rat.** *Nature* 1967.
16. Chiu K, Lau W-M, Yeung S-C, Chang RC-C, So K-F: **Retrograde labeling of retinal ganglion cells by application of fluoro-gold on the surface of superior colliculus.** *J Vis Exp* 2008:6–7.
17. Salinas-Navarro M, Mayor-Torroglosa S, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Holmes TM, Lund RD, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M: **A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats.** *Vision Res* 2009, **49**:115–26.
18. Zhang S, Wang H, Lu Q, Qing G, Wang N, Wang Y, Li S, Yang D, Yan F: **Detection of early neuron degeneration and accompanying glial responses in the visual pathway in a rat model of acute intraocular hypertension.** *Brain Res* 2009, **1303**:131–143.
19. Wilson GN, Inman DM, Denger-Crish CM, Smith M a, Crish SD: **Early pro-inflammatory cytokine elevations in the DBA/2J mouse model of glaucoma.** *J Neuroinflammation* 2015, **12**:176.

20. Gallego BI, Salazar JJ, de Hoz R, Rojas B, Ramírez AI, Salinas-Navarro M, Ortín-Martínez A, Valiente-Soriano FJ, Avilés-Trigueros M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM: **IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma.** *J Neuroinflammation* 2012, **9**:92.
21. Rojas B, Gallego BI, Ramírez AI, Salazar JJ, de Hoz R, Valiente-Soriano FJ, Avilés-Trigueros M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Triviño A, Ramírez JM: **Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers.** *J Neuroinflammation* 2014, **11**:133.
22. Muller M, Holländer H: **A small population of retinal ganglion cells projecting to the retina of the other eye.** *Exp Brain Res* 1988:611–617.
23. Avellaneda-Chevrier VK, Wang X, Hooper ML, Chauhan BC: **The retino-retinal projection: Tracing retinal ganglion cells projecting to the contralateral retina.** *Neurosci Lett* 2015, **591**:105–9.
24. Toth P, Straznický C: **Retino-retinal projections in three anuran species.** *Neurosci Lett* 1989, **104**:43–47.
25. Levkovitch-Verbin H: **Animal models of optic nerve diseases.** *Eye (Lond)* 2004, **18**:1066–74.
26. Nadal-Nicolás FM, Valiente-Soriano FJ, Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M: **Retino-retinal projection in juvenile and young adult rats and mice.** *Exp Eye Res* 2015, **134**:47–52.
27. Mittag TW, Danias J, Pohorenc G, Yuan HM, Burakgazi E, Redman RC, Podos SM, Tatton WG: **Retinal Damage after 3 to 4 Months of Elevated Intraocular Pressure in a Rat Glaucoma Model.** 2000.
28. Denoyer A, Godefroy D, Célérier I, Frugier J, Degardin J, Harrison JK, Brignole-Baudouin F, Picaud S, Baleux F, Sahel J a, Rostène W, Baudouin C: **CXCR3 antagonism of SDF-1(5-67) restores trabecular function and prevents retinal neurodegeneration in a rat model of ocular hypertension.** *PLoS One* 2012, **7**:e37873.

29. Lechauve C, Augustin S, Cwerman-Thibault H, Reboussin É, Roussel D, Lai-Kuen R, Saubamea B, Sahel J-A, Debeir T, Corral-Debrinski M: **Neuroglobin gene therapy prevents optic atrophy and preserves durably visual function in Harlequin mice.** *Mol Ther* 2014, **22**:1096–109.
30. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A: **Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.** *Nat Methods* 2012, **9**:676–82.
31. Tsou C, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF: **Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites.** *J Clin Invest* 2007, **117**:2–9.
32. May PJ: **The mammalian superior colliculus: laminar structure and connections.** *Prog Brain Res* 2006, **151**:321–78.
33. Roubex C, Godefroy D, Mias C, Sapienza A, Riancho L, Degardin J, Fradot V, Ivkovic I, Picaud S, Sennlaub F, Denoyer A, Rostene W, Sahel JA, Parsadaniantz SM, Brignole-Baudouin F, Baudouin C: **Intraocular pressure reduction and neuroprotection conferred by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an animal model of glaucoma.** *Stem Cell Res Ther* 2015, **6**:177.
34. Frankfort BJ, Khan a K, Tse DY, Chung I, Pang J-J, Yang Z, Gross RL, Wu SM: **Elevated intraocular pressure causes inner retinal dysfunction before cell loss in a mouse model of experimental glaucoma.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013, **54**:762–70.
35. Chen H, Zhao Y, Liu M, Feng L, Puyang Z, Yi J, Liang P, Zhang HF, Cang J, Troy JB, Liu X: **Progressive degeneration of retinal and superior collicular functions in mice with sustained ocular hypertension.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015, **56**:1971–84.
36. Tezel G, Chauhan BC, Leblanc RP, Wax MB: **Immunohistochemical Assessment of the Glial Mitogen- Activated Protein Kinase Activation in Glaucoma.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003, **44**.

37. Yuan L, Neufeld A: **Activated microglia in the human glaucomatous optic nerve head** . 2001, **64**:523–32.
38. Lam D, Jim J, To E, Rasmussen C, Kaufman PL, Matsubara J: **Astrocyte and microglial activation in the lateral geniculate nucleus and visual cortex of glaucomatous and optic nerve transected primates**. *Mol Vis* 2009, **15**(May):2217–29.
39. Bosco A, Steele MR, Vetter ML: **Early microglia activation in a mouse model of chronic glaucoma**. *J Comp Neurol* 2011, **519**:599–620.
40. Roh M, Zhang Y, Murakami Y, Thanos A, Lee SC, Vavvas DG, Benowitz LI, Miller JW: **Etanercept, a widely used inhibitor of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), prevents retinal ganglion cell loss in a rat model of glaucoma**. *PLoS One* 2012, **7**:e40065.
41. Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, Valiente-Soriano FJ, Jiménez-López M, Mayor-Torroglosa S, Avilés-Trigueros M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M: **Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration**. *Exp Eye Res* 2010, **90**:168–183.
42. Dengler-Crish CM, Smith M a, Inman DM, Wilson GN, Young JW, Crish SD: **Anterograde transport blockade precedes deficits in retrograde transport in the visual projection of the DBA/2J mouse model of glaucoma**. *Front Neurosci* 2014, **8**(September):290.
43. Dekeyster E, Aerts J, Valiente-Soriano FJ, De Groef L, Vreysen S, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Arckens L, Moons L: **Ocular Hypertension Results in Retinotopic Alterations in the Visual Cortex of Adult Mice**. *Curr Eye Res* 2015, **00**:1–15.
44. Ko M-L, Peng P-H, Ma M-C, Ritch R, Chen C-F: **Dynamic changes in reactive oxygen species and antioxidant levels in retinas in experimental glaucoma**. *Free Radic Biol Med* 2005, **39**:365–73.
45. Tezel G: **Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences**. *Prog Retin Eye Res* 2006, **25**:490–513.



46. Moreno MC, Campanelli J, Sande P, Sáenz D a., Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE: **Retinal Oxidative Stress Induced by High Intraocular Pressure.** *Free Radic Biol Med* 2004, **37**:803–812.
47. Almasieh M, Wilson AM, Morquette B, Cueva Vargas JL, Di Polo A: **The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma.** *Prog Retin Eye Res* 2012, **31**:152–81.
48. Herrera DG, Robertson HA: **activation of c-fos in the brain.** *Prog Neurobiol* 1996, **50**.
49. Katome T, Namekata K, Guo X, Semba K, Kittaka D, Kawamura K, Kimura a, Harada C, Ichijo H, Mitamura Y, Harada T: **Inhibition of ASK1-p38 pathway prevents neural cell death following optic nerve injury.** *Cell Death Differ* 2013, **20**:270–80.
50. Kikuchi M, Tenneti L, Lipton SA: **Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Axotomy-Induced Apoptosis of Rat Retinal Ganglion Cells.** 2000, **20**:5037–5044.
51. Danias J, Lee KC, Zamora M-F, Chen B, Shen F, Filippopoulos T, Su Y, Goldblum D, Podos SM, Mittag T: **Quantitative analysis of retinal ganglion cell (RGC) loss in aging DBA/2NNia glaucomatous mice: comparison with RGC loss in aging C57/BL6 mice.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003, **44**:5151–5162.
52. Friehs G., Parker RG, He LS, Haines SJ, Turner DA, Ebner TJ: **Lesioning of the Striatum Reverses Motor Asymmetry in the 6-Hydroxydopamine Rodent Model of Parkinsonism.** *J NEURALTRANSPLANTATION Plast* 1991, **2**:141–157.
53. Langmann T: **Microglia activation in retinal degeneration.** *J Leukoc Biol* 2007, **81**:1345–51.

## *Chapitre 3 : Discussion et perspectives*

---



Le glaucome primaire à angle ouvert (GPAO) est la forme la plus répandue de glaucome en Europe. C'est une forme lente et progressive qui conduit à la dégénérescence du nerf optique menant à une atteinte du champ visuel pouvant aller jusqu'à la cécité. Comme nous l'avons vu, l'élévation de la pression intraoculaire (PIO) est le principal facteur de risque du GPAO. La plupart des modèles expérimentaux de glaucomes consistent à élever la PIO par différents moyens (obstruction du trabéculum, cautérisation des veines épisclérales *etc.*). L'hypertonie oculaire (HTO) chez les animaux a montré des altérations similaires à celles retrouvées chez l'homme.

## 1- Similarités de notre modèle d'étude avec l'homme

Nous avons choisi pour nos expérimentations le modèle de cautérisation des veines épisclérales chez le rat, qui nous paraissait être pertinent. Ce modèle reproduit des altérations spécifiques du glaucome comme une augmentation de la PIO, une réduction de l'écoulement de l'humeur aqueuse, une dégénérescence progressive des CGR et une mort des cellules trabéculaires (Roubeix et al., 2015). En effet, sans altérer initialement le trabéculum il permet d'obtenir une HTO stable sur plusieurs semaines, à des niveaux très similaires de ceux constatés chez l'homme. Chez le rat Sprague-Dawley glaucomateux, une PIO supérieure à 25 mmHg est considérée comme élevée. De même, chez l'homme, la PIO est considérée comme pathologique dès qu'elle dépasse 21 mmHg (Kwon et al., 2009). Les relevés de la PIO chez le rat sont faiblement invasifs et sont effectués avec un tonomètre à rebond. Nous observons une augmentation stable de la PIO pendant au moins 6 semaines dans notre modèle. Cependant, d'autres groupes ont observé un retour à la normale de la PIO seulement 2 à 4 semaines après la cautérisation (Shareef et al., 1995) (Ahmed et al., 2001). Alors que d'autres chercheurs ont trouvé que la PIO restait élevée pendant plus de 7 mois (Neufeld et al., 2002). La différence majeure entre ces procédures expérimentales pourrait provenir de l'utilisation de souches de rats différentes.

Nous avons choisi d'étudier les phénomènes neuro-inflammatoires dans les structures visuelles 6 semaines après la cautérisation. En effet, à ce temps, nous avons observé des altérations similaires à celles retrouvées chez l'homme (Kwon et al., 2009). Dans notre modèle, la cautérisation conduit à une dégénérescence progressive des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) essentiellement en périphérie. La perte des CGR correspond à une diminution de 22 % en périphérie de la rétine en comparaison avec un animal naïf.

Le but premier de cette thèse était de caractériser l'inflammation dans les structures visuelles centrales de la rétine jusqu'au cerveau. Plusieurs études préalables ont montré une activation des cellules gliales dans la rétine et les nerfs optiques de patients atteints de GPAO (Tuccari et al., 1986) (Wang et al., 2001) (Yuan and Neufeld, 2001). Ces observations ont été également faites dans différents modèles de glaucome mais seulement au niveau des structures visuelles antérieures de l'œil (Tanihara et al., 1997) (Wang et al., 2000b) (Bosco et al., 2011). De plus, un groupe a montré récemment que l'œil controlatéral à la lésion, chez des souris glaucomateuses, présentait aussi des lésions de types inflammatoires (Gallego et al., 2012) (Rojas et al., 2014). En effet, il a été retrouvé un nombre plus important de cellules microgliales et une surexpression de la GFAP dans les rétines lésées et controlatérales en comparaison avec un animal naïf. Toutes ces observations nous ont amené à étudier dans notre modèle préclinique de glaucome, les processus inflammatoires dans les structures visuelles antérieures et postérieures du côté ipsi- et controlatéral à une hypertension oculaire unilatérale et de comprendre les mécanismes permettant la diffusion de l'inflammation parmi les différentes structures impliquées dans la vision.

## 2- Infiltration et caractérisation des cellules immunes

Nous avons observé que les rétines des yeux ipsi- et controlatéraux des rats glaucomateux présentaient un nombre plus élevé de macrophages tissulaires Iba1<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> comparé à des animaux naïfs. Cette augmentation cellulaire était corrélée avec une surexpression de CCL2 colocalisée avec les astrocytes dans la rétine des yeux ipsi- et controlatéraux. La chimiokine CCL2 (principal agoniste de CCR2 avec CCL7) a un rôle critique dans la régulation du recrutement des monocytes sur les sites inflammatoires. En effet, CCL2 permet principalement l'extravasation des monocytes de la moelle osseuse vers le sang, ainsi que de la circulation vers les tissus lésés à travers son récepteur CCR2, exprimé à la surface des monocytes (Tsou et al., 2007). Une étude a montré, par des analyses de cytométrie en flux, qu'il y a une augmentation du nombre de monocytes inflammatoires, issus de la périphérie, CD45<sup>hi</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> au niveau de la tête du nerf optique chez des souris glaucomateuses DBA/2J comparé à des contrôles (Howell et al., 2012). Il a été également montré une accumulation précoce de macrophages phagocytaires Iba1<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> dans la rétine de ces souris. Afin de compléter les données de notre étude il serait intéressant de pouvoir identifier les différents types de macrophages (résident et infiltrant) présents dans les tissus nerveux impliqués dans la vision. Chez la souris, il est très difficile de distinguer, en immunohistochimie, les microglies résidentes du tissu, des macrophages qui ont infiltré. En

effet, les marqueurs qui nous permettent de les différencier sont CCR2 et CX3CR1 mais les anticorps existant contre ces protéines sont peu fiables. Chez la souris, les microglies résidentes expriment fortement CX3CR1 (Geissmann et al., 2003) alors qu'elles n'expriment pas CCR2 (Mizutani et al., 2012). Au contraire, les monocytes de type inflammatoires qui vont être recrutés *via* CCR2 et qui infiltrent dans le tissu lésé expriment fortement CCR2 et faiblement CX3CR1 (Shi and Pamer, 2011). Il semblerait cependant que les monocytes infiltrés perdraient rapidement le CCR2 (Saederup et al., 2010). D'autres marqueurs existent qui permettraient de les distinguer mais seulement en cytométrie en flux ; les marqueurs Ly6c et CD45. Les macrophages infiltrés sont Ly6c<sup>high</sup> et CD45<sup>high</sup> alors que les microglies expriment peu Ly6c et CD45 (Shi and Pamer, 2011) (Lehmann et al., 2014). La présence ou l'absence de ces marqueurs sur les différentes populations de monocytes ou de macrophages a très bien été décrite chez la souris, cependant, chez le rat, peu de données sont à ce jour disponibles. Cela nous empêche malheureusement de pouvoir distinguer dans notre étude la population tissulaire de macrophages provenant de la circulation sanguine de la population microgliale résidente du tissu nerveux et de leur influence sur la pathologie glaucomateuse. Il a été montré que, dans un modèle de souris Alzheimer (APP), la délétion génétique de CCR2 est associée à une diminution de l'accumulation de phagocytes mononucléés dans le cerveau de ces souris (El Khoury et al., 2007).

Dans notre modèle de glaucome, il serait possible de bloquer pharmacologiquement l'infiltration des monocytes de la circulation sanguine vers la rétine et de compter les macrophages tissulaires résidants Iba1<sup>+</sup> dans la rétine et de comparer les résultats à un animal glaucomateux. Par comparaison, on obtiendrait le nombre de monocytes provenant de la périphérie lors d'une lésion rétinienne glaucomateuse. En effet, il a été montré dans un modèle expérimental de dégénérescence maculaire liée à l'âge, que la prolifération des macrophages tissulaires de la rétine était très limitée (Sennlaub et al., 2013). Cela suggère que les macrophages phagocytaires que nous observons dans la rétine des rats glaucomateux proviendraient essentiellement de la périphérie (monocytes).

Les moyens utilisés dans la littérature pour bloquer l'infiltration monocyttaire sont les antagonistes de CCR2 ou les liposomes de clodronate, qui éliminent les monocytes de la circulation. Notre groupe a déjà utilisé précédemment un antagoniste spécifique de CCR2, le composé INCB3344 (Brodmerkel et al., 2005) (Van Steenwinckel et al., 2014). En effet, il a été montré chez des rats naïfs que trois injections par jour en intraveineuse d'INCB3344 induisaient une monocytopenie (que les CCR2) caractérisée par une diminution de 50 % du nombre de monocytes CD11b<sup>+</sup> dans le sang.

Il paraît crucial de déterminer, dans notre étude, le rôle de CCL2 dans l'infiltration des cellules immunitaires et de façon plus large dans la pathologie glaucomateuse. En effet, le blocage de l'axe CCL2-CCR2 n'a jamais été fait dans un modèle de glaucome et permettrait

de comprendre l'influence de l'inflammation sur la mort des CGR et sur l'avancée de la pathologie glaucomateuse plus largement.

### 3- Activation de la voie p38

p38 est une kinase appartenant à la famille des mitogen-activated protein kinases (MAPK) et joue un rôle déterminant dans la réponse inflammatoire. L'activation de la voie phospho-p38 (p-p38) a été retrouvée dans la glie (astrocytes et cellules de Müller) de la rétine de patients atteints de glaucome (Tezel et al., 2003). Nous avons observé dans les CS gauches et droits des rats glaucomateux une activation de la voie p-p38 par les macrophages/microglies en comparaison à des animaux naïfs. L'injection intravitréenne d'un inhibiteur de la voie p38 (SB203580) après lésion du tectum chez l'embryon de poulet a montré une réduction de la mort par apoptose des CGR (Castagné and Clarke, 1999). Ces résultats ont été confirmés dans un modèle d'axotomie du nerf optique (Kikuchi et al., 2000). De plus, p38 est activé et phosphorylé par des stimulus comme les cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$  et IL-1 (Katome et al., 2013). p38 est aussi impliqué dans la production de TNF $\alpha$  par les cellules gliales (Tezel et al., 2003) (Yuan and Neufeld, 2000), ayant donc une conséquence néfaste sur la neurodégénérescence dans le glaucome. Cette observation est particulièrement intéressante dans notre étude du fait que nous trouvons une augmentation de l'expression génique de TNF $\alpha$  dans les CS gauches et droits des rats glaucomateux. p38 devient de plus en plus une cible émergente pour les thérapeutiques dans le traitement de pathologies comme Parkinson (Wilms et al., 2003) et Alzheimer (Munoz and Ammit, 2010). Les inhibiteurs de p38 ont été développés tout d'abord pour le traitement des pathologies inflammatoires périphériques comme l'arthrite rhumatoïde. La majorité des inhibiteurs n'avait donc pas l'utilité de pouvoir traverser la BHE (Munoz and Ammit, 2010). Comme nous l'avons vu dans la partie introductive de la thèse, la barrière hémato-rétinienne (BHR) est constituée par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, les astrocytes, les cellules de Müller et les péricytes. La perméabilité de la BHR est donc un élément crucial dans l'utilisation de ces inhibiteurs. En effet, il a été montré chez des patients glaucomateux qu'il y avait une augmentation de la perméabilité de la BHR caractérisée par une perturbation endothéliale (« fuite » de la fluorescéine) au niveau de la tête du nerf optique (Arend et al., 2005). Cette perturbation endothéliale paraît être le résultat d'un stress mécanique au niveau de la lame criblée. Ces données indiquent la possibilité de l'utilisation d'un inhibiteur de p38 dans notre modèle qui pourrait agir sur l'activation microgliale dans la rétine et dans les CS.

Nous avons observé dans notre modèle de glaucome unilatéral une augmentation de l'expression génique de TNF $\alpha$  dans les CS droits et gauches recevant les projections des CGR des deux yeux. En effet, le CS droit reçoit 10 à 15 % des fibres de l'œil droit et 85 à 90 % des fibres de l'œil gauche et inversement pour le CS gauche. La faible proportion de fibres de l'œil ipsilatéral pourrait potentiellement suffire à transmettre l'inflammation à l'œil controlatéral.

#### 4- Signalisation du TNF $\alpha$

Le TNF $\alpha$  est une cytokine impliquée dans de multiples processus tels que la réponse inflammatoire primaire, l'oncogénèse et la neurogénèse (Marin and Kipnis, 2013). La voie de signalisation du TNF $\alpha$  se fait à travers deux ligands (TNF soluble et transmembranaire) et deux récepteurs (TNFR1 et TNFR2) qui sont exprimés et régulés par différents types cellulaires. Le TNF $\alpha$  est produit en une forme liée à la membrane et est clivé par l'enzyme ADAM-17 (A Disintegrin And Metalloproteinase 17) pour libérer la forme soluble du TNF $\alpha$  (Moss et al., 1997). Lors de la réponse inflammatoire le TNF $\alpha$  soluble va lier préférentiellement son récepteur TNFR1 exprimé de façon ubiquitaire tandis que le TNFR2 est exprimé par peu de cellules comme les lymphocytes et les cellules endothéliales (il permet l'adhérence des leucocytes à l'endothélium vasculaire).

Le TNF $\alpha$  est sécrété principalement *in vivo* par les macrophages activés et par les monocytes (Fischer et al., 2015). Il peut être sécrété dans le cerveau en réponse à une infection ou à une lésion tissulaire menant à l'apoptose cellulaire et à l'activation microgliale, ce qui suggère sa participation à un mécanisme lié à des pathologies de types neurodégénératives. Le TNFR1, et son ligand principal le TNF $\alpha$  soluble, favorisent l'activation de signaux pro-inflammatoires à travers les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et l'activator protein 1 (AP-1) (Walczak, 2011). NF- $\kappa$ B induit la transcription de gènes qui codent pour des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et des facteurs anti-apoptotiques. Des niveaux élevés de TNF $\alpha$  ont été montrés chez des patients atteints pathologies chroniques inflammatoires incluant Alzheimer (Paganelli et al., 2002), Parkinson (Mogi et al., 1994) et le glaucome. En outre, plusieurs études ont montré une surexpression du TNF $\alpha$  et de son récepteur TNF-R1 lors d'une hypertension oculaire expérimentale (Tezel and Wax, 2000) (Tezel and Yang, 2004).

Un des premiers processus inflammatoires dans le SNC est une réactivité gliale. En effet, il a été montré *in vitro* qu'un stimulus inflammatoire comme le LPS ou des cytokines induisait la production de TNF $\alpha$  par les microglies et les astrocytes (Sawada et al., 1989). Dans notre modèle, l'injection du TNF $\alpha$  dans le CS entraîne une astrogliose et une activation des



macrophages/microglies. Cependant, sous certaines conditions comme l'ischémie cérébrale, le TNF $\alpha$  peut être aussi exprimé par les neurones lésés ou par les cellules immunitaires infiltrante (Botchkina et al., 1997). Le TNF $\alpha$  peut avoir des effets toxiques de par son rôle de médiateur lors d'un dommage tissulaire. En effet, une injection intracérébrale de TNF $\alpha$ , 24 h avant l'induction d'une ischémie, exacerbe le déficit neurologique chez les animaux et augmente la taille de la lésion (Barone et al., 1997). D'autre part, des souris transgéniques surexprimant le TNF $\alpha$  humain montrent des signes histologiques d'inflammation (astroglie) et de dégénérescence dans la moelle épinière (Akassoglou et al., 1997).

Nous avons vu précédemment que le TNF $\alpha$  induisait un signal inflammatoire à travers l'activation de NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B peut en retour induire la transcription de gènes pro-inflammatoires et le TNF $\alpha$  lui-même. De plus, il peut également activer les membres de la famille des MAPK incluant p38, c-jun N-terminal kinase (JNK) et extracellular-signal-regulated kinases (ERK). Ces MAPK sont d'importants promoteurs de l'inflammation et vont induire une augmentation de l'expression du TNF $\alpha$  (Sabio and Davis, 2014). Il est en effet connu que le TNF $\alpha$  fait partie d'un système d'auto amplification observé dans plusieurs types cellulaires (Neels et al., 2006). Cela s'avère être essentiel dans l'inflammation car le TNF $\alpha$  peut agir en amont de la production de molécules inflammatoires par les cellules gliales.

## 5- Le TNF $\alpha$ et la barrière hémato encéphalique

Nous avons vu que l'un des récepteurs du TNF $\alpha$  était exprimé par les cellules endothéliales. Cette donnée paraît intéressante pour notre étude. En effet, le TNF $\alpha$  a pour action de produire une augmentation de la perméabilité de la BHE (Kim et al., 1992). Il semblerait que selon la durée d'exposition au TNF $\alpha$ , la voie d'administration et la dose utilisée, il y aurait des différences dans la perméabilité de la BHE (Mayhan, 2002). Cette caractéristique a une grande importance car nous observons à la fois dans les CS des rats glaucomateux et des rats injectés au TNF $\alpha$  une surexpression de gènes impliqués dans l'activation des macrophages/microglies phagocytaires et une augmentation significative du nombre de macrophages/microglies phagocytaires Iba1<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>. Le TNF $\alpha$  paraît être un facteur important dans l'infiltration des cellules immunitaires dans le tissu. En effet, le TNF $\alpha$  stimule l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire grâce à la régulation de molécules de contact. Les cellules endothéliales affichent une variété de molécules d'adhésion pour les leucocytes comme l'E-selectin, l'intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) et la vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) (Pober et al., 1986). La sécrétion de chimiokines pro-

inflammatoires et les molécules d'adhésion vont permettre le recrutement puis la migration transendothéliale des leucocytes (Bradley, 2008).

## 6- Le TNF $\alpha$ et les produits thérapeutiques

Les inhibiteurs du TNF $\alpha$  et de ses deux récepteurs (anticorps monoclonaux et protéines de fusion) ont été utilisés avec succès pour le traitement de maladies telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, l'arthrite rhumatoïde ou le psoriasis. Cependant, le blocage total du TNF $\alpha$  peut induire des effets secondaires très néfastes du fait de son rôle physiologique et pathologique. En effet, il peut augmenter le risque d'infection, d'inflammation et de tuberculose (Targownik and Bernstein, 2013). Cela est dû aux différents rôles des récepteurs du TNF $\alpha$ , quand l'un conduit à l'activation de la voie inflammatoire (TNFR1), l'autre est impliqué dans l'homéostasie et la régénération tissulaire (TNFR2). Par conséquent, le blocage spécifique de la signalisation de TNFR1, soit par inhibition directe avec des antagonistes de TNFR1 ou bien en ciblant le TNF $\alpha$  soluble peut prévenir les effets néfastes associés aux inhibiteurs du TNF $\alpha$  totaux et constitue la nouvelle génération de thérapeutiques ciblant la voie du TNF $\alpha$  (Fischer et al., 2015). Cependant, une étude a montré dans un modèle de glaucome que l'Etanercept (inhibiteur du TNF $\alpha$  soluble et membranaire) inhibe l'activation microgliale et prévient la mort des CGR sans baisser la PIO (Roh et al., 2012). La persistance de la PIO n'est donc pas un frein à la survie des CGR. Dans un modèle de glaucome chez le rat, par injection de solution salée dans les veines épisclérales, l'injection intravitréenne d'un inhibiteur de la forme soluble du TNF $\alpha$  (XPro1595) protège les CGR (Cueva Vargas et al., 2015).

De nouvelles thérapies ont vu le jour par l'utilisation de molécules inhibitrices de la spleen tyrosine kinase (SYK), de la Janus kinase et de p38, impliquées dans les voies de signalisation en aval du TNF $\alpha$  (Brenner et al., 2015). Cependant, l'utilisation d'un inhibiteur de la voie JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) dans un modèle de glaucome a montré des effets inverses (Huang et al., 2007). En effet, l'inhibition de la voie JAK/STAT a causé la mort des CGR d'explants rétiniens d'yeux hypertendus. Les voies de signalisation du TNF $\alpha$  sont assez complexes et nécessitent encore un approfondissement des connaissances. Cependant, la voie TNF $\alpha$  soluble/TNFR1 représente une cible thérapeutique évidente pour le traitement des pathologies chroniques inflammatoires (Probert, 2015).

Nous avons choisi le TNF $\alpha$  pour induire une inflammation localisée dans le CS droit afin d'observer si l'inflammation dans un seul SC était suffisante pour induire une inflammation dans l'œil ipsilatéral à l'injection. En effet, nous avons émis l'hypothèse que l'inflammation observée dans l'œil dont les veines épisclérales avaient été cautérisées pouvait se transmettre à l'œil controlatéral à travers les CS par des communications intercellulaires entre neurones et cellules gliales.

## 7- Choix de l'utilisation du TNF $\alpha$ pour notre modèle d'inflammation du Colliculus

Nous avons observé, dans notre modèle d'hypertonie oculaire unilatérale, une augmentation bilatérale de l'expression génique du TNF $\alpha$  dans les CS. Nous avons donc trouvé pertinent l'utilisation de cette chimiokine pro-inflammatoire et nous avons choisi de développer un modèle d'inflammation par injection de TNF $\alpha$  recombinant dans le CS droit afin d'observer si l'inflammation se transmettait à l'autre CS, aux yeux gauches et droits par l'intermédiaire des fibres des CGR et si cela engendrerait des déficits visuels. En effet il a été montré que l'injection du TNF $\alpha$  recombinant dans le lobe pariétal de rats normaux occasionnait une invasion de leucocytes circulants sur le site d'injection, l'infiltrat étant composé principalement de macrophages et de neutrophiles (Wright and Merchant, 1992). De plus, à l'aide de la peroxydase de raifort, un traceur de la perméabilité de la BHE, les auteurs ont constaté que le TNF $\alpha$  provoquait une rupture temporaire de l'intégrité de la BHE (Wright and Merchant, 1994). Un autre groupe a montré qu'une injection intracérébrale de TNF $\alpha$  chez le rat induisait une activation des microglies et une astrogliose sur le site de l'injection (Cai et al., 2004). Ces données confirment notre choix pour le TNF $\alpha$  comme facteur inducteur d'inflammation.

## 8- L'inflammation induite dans le colliculus supérieur est-elle suffisante à induire une inflammation dans les deux yeux ?

Comme nous l'avons dit précédemment, un groupe travaillant sur les marqueurs cellulaires de l'inflammation dans le glaucome a montré que l'œil controlatéral à la lésion chez des souris glaucomateuses présentait aussi des altérations de types inflammatoires (Gallego et al., 2012) (Rojas et al., 2014). En effet, ils ont observé une surexpression de la GFAP et une réactivité de la microglie dans la rétine des yeux ipsi- et controlatéraux à la lésion

glaucomeuse. Ils ont observé des lésions tissulaires mais n'ont pas proposé de mécanismes quant à la transmission de l'inflammation à l'œil controlatéral.

Par des études en IRM chez l'homme, des observations ont montré l'atteinte des voies visuelles postérieures chez des patients atteints de glaucome. En effet, il a été montré que l'atteinte des voies visuelles était toujours bilatérale même en cas de symptomatologie unilatérale (Iba-Zizen et al., 2008) avec cependant, une asymétrie avec prédominance du côté cliniquement symptomatique.

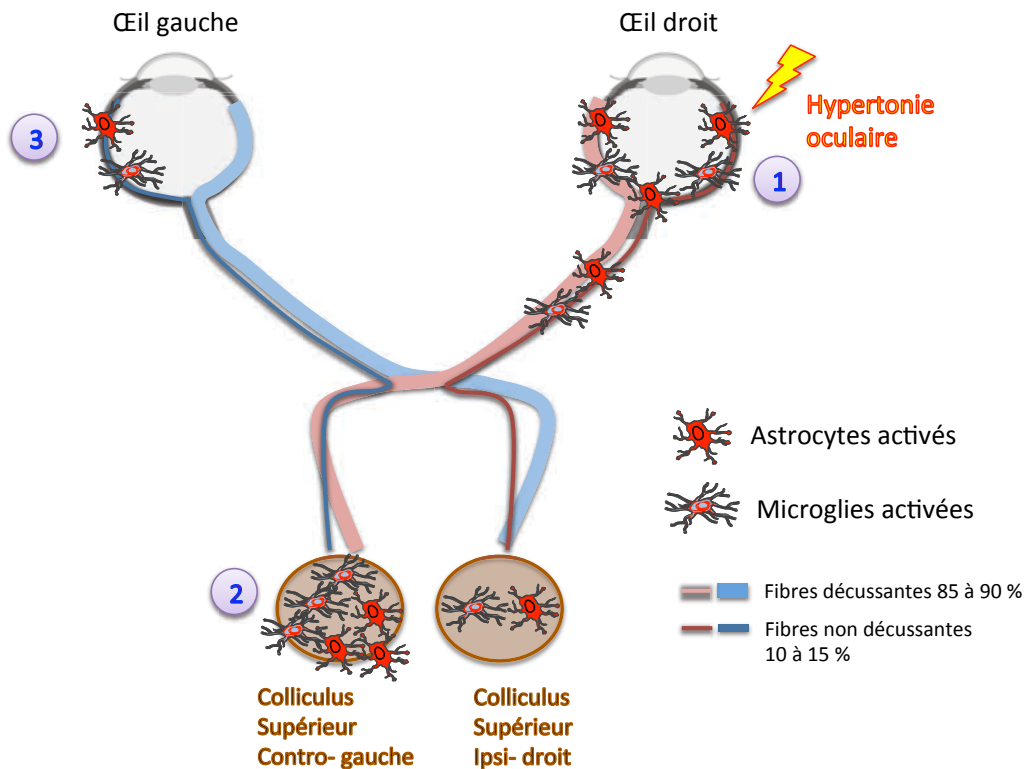
A partir de ces observations et en prenant en compte l'état des connaissances chez l'homme de l'atteinte des voies visuelles, nous avons émis l'hypothèse que le CS pourrait être, chez le rongeur, un lieu d'échange et de communication intercellulaire entre les terminaisons axonales des CGR entre elles et avec les cellules gliales.

Comme nous l'avons vu dans la partie introductive, une différence anatomique, au niveau des voies visuelles postérieures, existe entre l'homme et le rongeur. En effet, chez l'homme, 80 à 90 % des cellules ganglionnaires, après décussation, projettent sur le corps genouillé latéral (CGL) (Gupta and Yücel, 2007). Alors que chez le rongeur, après décussation, 90 à 98 % des cellules ganglionnaires projettent sur le CS (Forrester, 1967) (Chiu et al., 2008) (Salinas-Navarro et al., 2009). Ces structures n'ont pas le même rôle dans la vision, cependant notre hypothèse s'adapte à notre modèle expérimental et chez l'homme. En effet, les deux structures reçoivent des fibres des CGR provenant des deux yeux. Chez le rongeur, le CS droit reçoit à peu près 10 à 15 % des fibres de l'œil droit et 85 à 90 % des fibres de l'œil gauche et inversement pour le CS gauche (Figure 19). Chez l'homme, les deux CGL reçoivent environ 50 % des fibres des RGC des deux yeux. Ces différences anatomiques suggèrent que les altérations observées chez le rat seraient donc plus importantes chez l'homme. En effet, cela explique l'atteinte bilatérale dans le cerveau de patients atteints d'un glaucome unilatéral.

Les CGR lésées de l'œil atteint par l'hypertonie oculaire produiraient des signaux de stress et de mort qui affecteraient les cellules cibles dans le CGL. Un défaut de transport axonal menant à une souffrance axonale serait une des origines de la mort des CGR, du fait du déficit en facteurs neurotrophiques qui proviennent normalement des structures cibles des CGR dans le cerveau (Almasieh et al., 2012). Il est maintenant montré que les neurones des structures cibles des CGR présentent une atrophie dans les glaucomes cliniques et expérimentaux (Gupta et al., 2006). Dans les processus inflammatoires, il est connu que les cellules gliales sont importantes dans la communication avec les neurones afin de répondre à leurs signaux. Les signaux neuronaux peuvent soit maintenir un état quiescent soit induire une activation des cellules gliales (Biber et al., 2007). Lors d'un stress neuronal, l'ATP peut

être sécrété par les neurones dans le milieu extracellulaire et initier l'activation gliale (Fields and Burnstock, 2006). Le milieu inflammatoire présent au niveau des CS va participer à la souffrance des fibres des CGR provenant de l'œil controlatéral par des mécanismes non autonomes cellulaires (Lobsiger and Cleveland, 2007) (Figure 19). Dans notre modèle, où l'œil droit présente une hypertonie oculaire, les 10 à 15 % des fibres des CGR de l'œil gauche sont donc en souffrance. Cette souffrance provient du milieu inflammatoire dans le CS gauche (controlatéral) qui va induire une inflammation dans l'œil gauche où se trouvent leurs corps cellulaires.

Dans notre modèle d'hypertension oculaire, nous avons exploré la réponse inflammatoire dans le CS mais pas au niveau de la structure d'intégration des informations visuelles, le cortex visuel. Les neurones relais du CGL empruntent les radiations optiques pour se connecter dans les couches du cortex visuel primaire (V1). Des études en IRM de cerveaux de patients glaucomateux ont montré une diminution de l'épaisseur corticale des voies visuelles (Yu et al., 2015). De plus, il a été montré, dans un modèle de glaucome par photocoagulation du trabéculum chez le singe, qu'il y avait une augmentation de l'immunoréactivité de la GFAP dans les couches de V1 correspondant à l'œil traité (Lam et al., 2009b). La détection précoce de ces changements, associés au glaucome, par imagerie non invasive du cerveau des patients paraît être très utile dans le diagnostic.



**Figure 19 :** Représentation schématique de la voie rétino-colliculaire chez le rat et des processus inflammatoires retrouvés lors d'une hypertonie oculaire unilatérale. 1) L'hypertonie oculaire est induite dans l'œil droit par cautérisation des veines épisclérales. 2) Les fibres des CGR de l'œil droit projettent dans le CS controlatéral (gauche) et induisent une réaction inflammatoire. 3) Les fibres des CGR provenant de l'œil controlatéral (gauche) et projetant dans le CS gauche vont envoyer des signaux inflammatoires à leurs corps cellulaires et induire une inflammation dans la rétine de l'œil gauche.

Notre modèle d'injection du  $\text{TNF}\alpha$  dans le CS droit de rats naïfs avait pour but ultime de montrer que le CS était au cœur de la transmission des signaux inflammatoires entre les différents types cellulaires. Un modèle d'induction de neurodégénérescence de nature rétrograde avait montré qu'il était possible de léser les corps cellulaires de neurones en affectant directement leurs terminaisons synaptiques. En effet, le modèle 6-OHDA (6-Hydroxydopamine) de la maladie de Parkinson consiste en l'injection de la 6-OHDA dans le striatum où se trouvent les terminaisons axonales des neurones dopaminergiques. Cette toxine provoque la lésion des terminaisons nerveuses puis une dégénérescence rétrograde. Les corps cellulaires des neurones dopaminergiques, situés dans la substance noire *pars compacta*, meurent en plusieurs jours (Sauer and Oertel, 1994).

Le  $\text{TNF}\alpha$  va créer une inflammation dans le CS droit, lieu de l'injection. Les terminaisons axonales des CGR vont être activées (les 85 % et les 15 % du même CS) et vont induire un stress neuronal dans les rétines. Au niveau de l'œil, l'inflammation peut n'avoir aucun effet ou bien peut participer au stress neuronal des CGR. Dans notre modèle nous voyons une

augmentation du nombre de macrophages phagocytaires Iba1<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> dans la rétine de l'œil gauche mais aussi de l'œil droit comparé à un animal naïf. Ce résultat semble indiquer que l'inflammation du CS droit par le TNF $\alpha$  est suffisante pour sensibiliser les fibres des CGR (les 15 %) provenant de l'œil droit. Afin de déterminer si les CGR sont en souffrance, il serait utile de quantifier l'expression d'un marqueur de stress neuronal dans les rétines des yeux des animaux injectés au TNF $\alpha$ . Nous pourrions utiliser ATF3 (Activating transcription factor 3) dont le gène et la protéine sont exprimés très faiblement dans les neurones. Cependant, en réponse à une lésion, leur expression est rapidement augmentée (Hunt et al., 2012) ; ce marqueur devient alors un bon traceur du stress neuronal. Cela nous permettrait de confirmer le rôle de l'inflammation dans stress voire la mort neuronale.

L'inflammation peut donc se propager entre les structures visuelles dans le glaucome. Il est aujourd'hui clair que l'inflammation peut intervenir dans la dégénérescence neuronale dans différentes affections du SNC comme Parkinson ou Alzheimer. Il serait donc intéressant d'évaluer la contribution de l'inflammation dans la mort des CGR dans notre modèle de glaucome. En effet, nous pourrions amplifier l'inflammation dans notre modèle de glaucome afin d'observer si une inflammation plus importante pourrait accélérer la mort des CGR. En plus de la cautérisation des veines épisclérales, il serait possible de pratiquer une injection intravitréenne de TNF $\alpha$  et d'observer la cinétique de mort des CGR à différents temps après la chirurgie. Il serait aussi prometteur d'inhiber la voie du TNF $\alpha$  soluble par des antagonistes afin de ralentir ou même de bloquer la mort des CGR.

## *Références bibliographiques*

---



- Aderem, A., Ulevitch, R.J., 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406.
- Aggarwal, B.B., 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 745–756. doi:10.1038/nri1184
- Ahmed, F.A., Hegazy, K., Chaudhary, P., Sharma, S.C., 2001. Neuroprotective effect of alpha(2) agonist (brimonidine) on adult rat retinal ganglion cells after increased intraocular pressure. *Brain Res.* 913, 133–139.
- Akassoglou, K., Probert, L., Kontogeorgos, G., Kollias, G., 1997. Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice. *J. Immunol.* 158, 438–445. doi:8977220
- Almasieh, M., Wilson, A.M., Morquette, B., Cueva Vargas, J.L., Di Polo, A., 2012. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Prog. Retin. Eye Res.* 31, 152–81. doi:10.1016/j.preteyeres.2011.11.002
- Andersen, J.K., 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat med* 10 Suppl, S18–S25. doi:10.1038/nrn1434
- Anderson, M.G., Libby, R.T., Mao, M., Cosma, I.M., Wilson, L. a, Smith, R.S., John, S.W.M., 2006. Genetic context determines susceptibility to intraocular pressure elevation in a mouse pigmentary glaucoma. *BMC Biol.* 4, 20. doi:10.1186/1741-7007-4-20
- Arend, O., Remky, A., Plange, N., Kaup, M., Schwartz, B., 2005. Fluorescein leakage of the optic disc in glaucomatous optic neuropathy. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 243, 659–664. doi:10.1007/s00417-004-1092-7
- Barone, F.C., Arvin, B., White, R.F., Miller, A., Webb, C.L., Willette, R.N., Lysko, P.G., Feuerstein, G.Z., 1997. Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 28, 1233–1244.
- Baudouin, C., Denoyer, A., Rostène, W., 2013. Glaucoma today: detection and therapeutic progress. *Biol. Aujourd'hui.* 207, 87–95. doi:10.1051/jbio/2013009
- Benarroch, E.E., 2013. Microglia Multiple roles in surveillance , circuit shaping , and response to injury. *Am. Acad. Neurol.* 1079–1088.
- Berdahl, J.P., Allingham, R.R., Johnson, D.H., 2008. Cerebrospinal Fluid Pressure Is Decreased in Primary Open-angle Glaucoma. *Ophthalmology* 115, 763–768. doi:10.1016/j.ophtha.2008.01.013
- Berdahl, J.P., Fautsch, M.P., Stinnett, S.S., Allingham, R.R., 2008. Intracranial pressure in primary open angle glaucoma, normal tension glaucoma, and ocular hypertension: a case-control study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 5412–5418. doi:10.1167/iovs.08-2228
- Biber, K., Neumann, H., Inoue, K., Boddeke, H.W.G.M., 2007. Neuronal “On” and “Off” signals control microglia. *Trends Neurosci.* doi:10.1016/j.tins.2007.08.007

- Bonomi, L., Marchini, G., Marraffa, M., Bernardi, P., De Franco, I., Perfetti, S., Varotto, A., 2000. Epidemiology of angle-closure glaucoma: Prevalence, clinical types, and association with peripheral anterior chamber depth in Egna-Neumarkt glaucoma study. *Ophthalmology* 107, 998–1003. doi:10.1016/S0161-6420(00)00022-1
- Booij, J.C., Baas, D.C., Beisekeeva, J., Gorgels, T.G.M.F., Bergen, A.A.B., 2010. The dynamic nature of Bruch's membrane. *Prog. Retin. Eye Res.* doi:10.1016/j.preteyeres.2009.08.003
- Bosco, A., Inman, D.M., Steele, M.R., Wu, G., Soto, I., Marsh-Armstrong, N., Hubbard, W.C., Calkins, D.J., Horner, P.J., Vetter, M.L., 2008. Reduced retina microglial activation and improved optic nerve integrity with minocycline treatment in the DBA/2J mouse model of glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 1437–46. doi:10.1167/iovs.07-1337
- Bosco, A., Steele, M.R., Vetter, M.L., 2011. Early microglia activation in a mouse model of chronic glaucoma. *J Comp Neurol* 519, 599–620. doi:10.1002/cne.22516.Early
- Botchkina, G.I., Meistrell, M.E., Botchkina, I.L., Tracey, K.J., 1997. Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. *Mol. Med.* 3, 765–781.
- Boucard, C.C., Hernowo, A.T., Maguire, R.P., Jansonius, N.M., Roerdink, J.B.T.M., Hooymans, J.M.M., Cornelissen, F.W., 2009. Changes in cortical grey matter density associated with long-standing retinal visual field defects. *Brain* 132, 1898–1906. doi:10.1093/brain/awp119
- Bozkurt, B., Mesci, L., Irkeç, M., Ozdag, B.B., Sanal, O., Arslan, U., Ersoy, F., Tezcan, I., 2011. Association of tumour necrosis factor- $\alpha$  -308 G/A polymorphism with primary open-angle glaucoma. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 40, e156–62. doi:10.1111/j.1442-9071.2011.02595.x
- Bradley, J.R., 2008. TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* 214, 149–160. doi:10.1002/path
- Brenner, D., Blaser, H., Mak, T.W., 2015. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 362–374. doi:10.1038/nri3834
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S.N., Osborne, N.N., Reichenbach, A., 2006. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog. Retin. Eye Res.* doi:10.1016/j.preteyeres.2006.05.003
- Brodmerkel, C.M., Huber, R., Covington, M., Diamond, S., Hall, L., Collins, R., Leffet, L., Gallagher, K., Feldman, P., Collier, P., Stow, M., Gu, X., Baribaud, F., Shin, N., Thomas, B., Burn, T., Hollis, G., Yeleswaram, S., Solomon, K., Friedman, S., Wang, a., Xue, C.B., Newton, R.C., Scherle, P., Vaddi, K., 2005. Discovery and Pharmacological Characterization of a Novel Rodent-Active CCR2 Antagonist, INCB3344. *J. Immunol.* 175, 5370–5378. doi:10.4049/jimmunol.175.8.5370
- Briesch, S.R., Arey, L.B., 1942. The number of myelinated and unmyelinated fibers in the optic nerve of vertebrates. *J Comp Neurol* 631–665.
- Bunt, S.M., Lund, R.D., 1981. Development of a transient retino-retinal pathway in hooded and albino rats. *Brain Res.* 211, 399–404.
- Burgoyne, C.F., Downs, J.C., Bellezza, A.J., Suh, J.-K.F., Hart, R.T., 2005. The optic nerve head as a biomechanical structure: a new paradigm for understanding the role of IOP-related stress and

- strain in the pathophysiology of glaucomatous optic nerve head damage. *Prog. Retin. Eye Res.* 24, 39–73. doi:10.1016/j.preteyeres.2004.06.001
- Cai, Z., Lin, S., Pang, Y., Rhodes, P.G., 2004. Brain injury induced by intracerebral injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in the neonatal rat. *Pediatr. Res.* 56, 377–84. doi:10.1203/01.PDR.0000134249.92944.14
- Cardona, A.E., Pioro, E.P., Sasse, M.E., Kostenko, V., Cardona, S.M., Dijkstra, I.M., Huang, D., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., Lee, J.-C., Cook, D.N., Jung, S., Lira, S. a, Littman, D.R., Ransohoff, R.M., 2006. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat. Neurosci.* 9, 917–24. doi:10.1038/nn1715
- Carter-Dawson, L., Crawford, M.L.J., Harwerth, R.S., Smith, E.L., Feldman, R., Shen, F.F., Mitchell, C.K., Whitree, A., 2002. Vitreal glutamate concentration in monkeys with experimental glaucoma. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 2633–2637.
- Castagné, V., Clarke, P.G.H., 1999. Inhibitors of mitogen-activated protein kinases protect axotomized developing neurons. *Brain Res.* 842, 215–219. doi:10.1016/S0006-8993(99)01823-5
- Chaturvedi, N., Hedley-Whyte, E.T., Dreyer, E.B., 1993. Lateral geniculate nucleus in glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.* 116, 182–188.
- Chen, H., Weber, A.J., 2001. BDNF enhances retinal ganglion cell survival in cats with optic nerve damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 966–974.
- Chiu, K., Lau, W.-M., Yeung, S.-C., Chang, R.C.-C., So, K.-F., 2008. Retrograde labeling of retinal ganglion cells by application of fluoro-gold on the surface of superior colliculus. *J. Vis. Exp.* 6–7. doi:10.3791/819
- Chrysostomou, V., Rezaia, F., Trounce, I. a, Crowston, J.G., 2013. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in glaucoma. *Curr. Opin. Pharmacol.* 13, 12–5. doi:10.1016/j.coph.2012.09.008
- Colafrancesco, V., Parisi, V., Sposato, V., Rossi, S., Russo, M.A., Coassin, M., Lambiase, A., Aloe, L., 2011. Ocular application of nerve growth factor protects degenerating retinal ganglion cells in a rat model of glaucoma. *J. Glaucoma* 20, 100–108. doi:10.1097/IJG.0b013e3181d787e5
- Combadière, C., Feumi, C., Raoul, W., Keller, N., Rodéro, M., Pézard, A., Lavalette, S., Houssier, M., Jonet, L., Picard, E., Debré, P., Sirinyan, M., Deterre, P., Ferroukhi, T., Cohen, S., Chauvaud, D., Jeanny, J., Chemtob, S., Behar-cohen, F., Sennlaub, F., 2007. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J. Clin. Invest.* 117. doi:10.1172/JCI31692DS1
- Cueva Vargas, J.L., Osswald, I.K., Unsain, N., Arousseau, M.R., Barker, P. a., Bowie, D., Di Polo, a., 2015. Soluble Tumor Necrosis Factor Alpha Promotes Retinal Ganglion Cell Death in Glaucoma via Calcium-Permeable AMPA Receptor Activation. *J. Neurosci.* 35, 12088–12102. doi:10.1523/JNEUROSCI.1273-15.2015
- Dai, H., Morelli, J.N., Ai, F., Yin, D., Hu, C., Xu, D., Li, Y., 2013. Resting-state functional MRI: functional connectivity analysis of the visual cortex in primary open-angle glaucoma patients. *Hum. Brain Mapp.* 34, 2455–63. doi:10.1002/hbm.22079

- Dai, H., Mu, K.T., Qi, J.P., Wang, C.Y., Zhu, W.Z., Xia, L.M., Chen, Z.Q., Zhang, H., Ai, F., Morelli, J.N., 2011. Assessment of lateral geniculate nucleus atrophy with 3T MR imaging and correlation with clinical stage of glaucoma. *Am. J. Neuroradiol.* 32, 1347–53. doi:10.3174/ajnr.A2486
- Danias, J., Shen, F., Kavalarakis, M., Chen, B., Goldblum, D., Lee, K., Zamora, M.-F., Su, Y., Brodie, S.E., Podos, S.M., Mittag, T., 2006. Characterization of retinal damage in the episcleral vein cauterization rat glaucoma model. *Exp. Eye Res.* 82, 219–28. doi:10.1016/j.exer.2005.06.013
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V, Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., Gan, W.-B., 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8, 752–8. doi:10.1038/nn1472
- De Berardinis, E., Tieri, O., Polzella, A., Iuglio, N., 1965. The Chemical Composition of the Human Aqueous Humour in normal and Pathological Conditions. *Exp. Eye Res.* 179–186.
- Dekeyster, E., Aerts, J., Valiente-Soriano, F.J., De Groef, L., Vreysen, S., Salinas-Navarro, M., Vidal-Sanz, M., Arckens, L., Moons, L., 2015. Ocular Hypertension Results in Retinotopic Alterations in the Visual Cortex of Adult Mice. *Curr. Eye Res.* 00, 1–15. doi:10.3109/02713683.2014.990983
- Dreyer, E.B., Zurakowski, D., Schumer, R.A., Podos, S.M., Lipton, S.A., 1996. Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* 114, 299–305. doi:10.1001/archoph.1996.01100130295012
- Dvorianchikova, G., Barakat, D., Brambilla, R., Agudelo, C., Hernandez, E., Bethea, J.R., Shestopalov, V.I., Ivanov, D., 2009. Inactivation of astroglial NF-kappa B promotes survival of retinal neurons following ischemic injury. *Eur. J. Neurosci.* 30, 175–185. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06814.x
- Ebneter, A., Casson, R.J., Wood, J.P.M., Chidlow, G., 2010. Microglial activation in the visual pathway in experimental glaucoma: spatiotemporal characterization and correlation with axonal injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 6448–60. doi:10.1167/iovs.10-5284
- El Khoury, J., Toft, M., Hickman, S.E., Means, T.K., Terada, K., Geula, C., Luster, A.D., 2007. Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat. Med.* 13, 432–8. doi:10.1038/nm1555
- Engelhorn, T., Michelson, G., Waerntges, S., Struffert, T., Haider, S., Doerfler, A., 2011. Diffusion Tensor Imaging Detects Rarefaction of Optic Radiation in Glaucoma Patients. *Acad. Radiol.* 18, 764–769. doi:10.1016/j.acra.2011.01.014
- Fan, B.J., Liu, K., Wang, D.Y., Tham, C.C.Y., Tam, P.O.S., Lam, D.S.C., Pang, C.P., 2010. Association of polymorphisms of tumor necrosis factor and tumor protein p53 with primary open-angle glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 4110–4116. doi:10.1167/iovs.09-4974
- Fields, R.D., Burnstock, G., 2006. Purinergic signalling in neuron–glia interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 423–436. doi:10.1038/nrn1928
- Fischer, R., Kontermann, R., Maier, O., 2015. Targeting sTNF/TNFR1 Signaling as a New Therapeutic Strategy. *Antibodies* 4, 48–70. doi:10.3390/antib4010048

- Flachsbarth, K., Kruszewski, K., Jung, G., Jankowiak, W., Riecken, K., Wagenfeld, L., Richard, G., Fehse, B., Bartsch, U., 2014. Neural stem cell-based intraocular administration of ciliary neurotrophic factor attenuates the loss of axotomized ganglion cells in adult mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 7029–39. doi:10.1167/iov.14-15266
- Forrester, J. and P., 1967. Nerve fibres in optic nerve in rat. *Nature*.
- Foster, P.J., Buhrmann, R., Quigley, H.A., Johnson, G.J., 2002. The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys. *Br. J. Ophthalmol.* 238–243.
- Foster, P.J., Johnson, G.J., 2001. Glaucoma in China: how big is the problem? *Br. J. Ophthalmol.* 85, 1277–1282. doi:10.1136/bjo.85.11.1277
- Franco, R., Fernández-Suárez, D., 2015. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* doi:10.1016/j.pneurobio.2015.05.003
- Fruttiger, M., 2007. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis* 10, 77–88. doi:10.1007/s10456-007-9065-1
- Fu, R., Shen, Q., Xu, P., Luo, J.J., Tang, Y., 2014. Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Mol. Neurobiol.* 49, 1422–34. doi:10.1007/s12035-013-8620-6
- Gaasterland, D., Kupfer, C., 1974. Experimental glaucoma in the rhesus. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 13, 4208801.
- Gallego, B.I., Salazar, J.J., de Hoz, R., Rojas, B., Ramírez, A.I., Salinas-Navarro, M., Ortín-Martínez, A., Valiente-Soriano, F.J., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., Triviño, A., Ramírez, J.M., 2012. IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. *J. Neuroinflammation* 9, 92. doi:10.1186/1742-2094-9-92
- Gandhi, N.J., Katnani, H.A., 2011. Motor functions of the superior colliculus. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 205–231. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113728
- Garaci, F.G., Bolacchi, F., Cerulli, A., Melis, M., Spanò, A., Cedrone, C., Floris, R., Simonetti, G., Nucci, C., 2009. Optic nerve and optic radiation neurodegeneration in patients with glaucoma: in vivo analysis with 3-T diffusion-tensor MR imaging. *Radiology* 252, 496–501. doi:10.1148/radiol.2522081240
- Geissmann, F., Jung, S., Littman, D.R., 2003. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity* 19, 71–82.
- González, H., Elgueta, D., Montoya, A., Pacheco, R., 2014. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J. Neuroimmunol.* 274, 1–13. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.07.012
- Gordon, M.O., Beiser, J.A., Randt, J.D., Heuer, D.K., Higginbotham, E.J., Johnson, C.A., Keltner, J.L., Miller, J.P., Li, R.K.P., Wilson, M.R., 2002. The Ocular Hypertension Treatment Study: Baseline Factors That Predict the Onset of Primary Open-Angle Glaucoma. *ARCH OPHTHALMOL* 120.

- Goyal, A., Srivastava, A., Sihota, R., Kaur, J., 2014. Evaluation of Oxidative Stress Markers in Aqueous Humor of Primary Open Angle Glaucoma and Primary Angle Closure Glaucoma Patients. *Curr. Eye Res.* 00, 1–7. doi:10.3109/02713683.2011.556299
- Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R., Ferguson, T.A., 1995. Mechanism of Immune Privilege AC. *Science* (80-. ). 270, 1189–1192.
- Grus, F.H., Joachim, S.C., Pfeiffer, N., 2007. Proteomics in ocular fluids. *Proteomics. Clin. Appl.* 1, 876–88. doi:10.1002/prca.200700105
- Gupta, N., Ang, L.-C., Noël de Tilly, L., Bidaisee, L., Yücel, Y.H., 2006. Human glaucoma and neural degeneration in intracranial optic nerve, lateral geniculate nucleus, and visual cortex. *Br. J. Ophthalmol.* 90, 674–8. doi:10.1136/bjo.2005.086769
- Gupta, N., Greenberg, G., de Tilly, L.N., Gray, B., Polemidiotis, M., Yücel, Y.H., 2009. Atrophy of the lateral geniculate nucleus in human glaucoma detected by magnetic resonance imaging. *Br. J. Ophthalmol.* 93, 56–60. doi:10.1136/bjo.2008.138172
- Gupta, N., Yücel, Y.H., 2007. Glaucoma as a neurodegenerative disease. *Curr Opin Ophthalmol* 113, 1120–5.
- Hanisch, U.-K., Kettenmann, H., 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10, 1387–94. doi:10.1038/nn1997
- Harada, T., Harada, C., Nakamura, K., Quah, H.A., Okumura, A., Namekata, K., Saeki, T., Aihara, M., Yoshida, H., Mitani, A., Tanaka, K., 2007. The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J. Clin. Invest.* 117, 1763–1770. doi:10.1172/JCI30178.and
- Harwerth, R.S., Quigley, H.A., 2006. Visual Field Defects and Retinal Ganglion Cell Losses in Human Glaucoma Patients. *Arch Ophthalmol.* 124, 853–859.
- Hattar, S., Liao, H.W., Takao, M., Berson, D.M., Yau, K.W., 2002. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295, 1065–1070. doi:10.1126/science.1069609
- Hein, K., Bähr, M., 2010. Optic Nerve : Optic Neuritis. *Encycl. Eye. Acad. Press. Oxford* pages 205–209.
- Hernandez, M.R., Miao, H., Lukas, T., 2008. Astrocytes in glaucomatous optic neuropathy. *Prog. Brain Res.* 173, 353–73. doi:10.1016/S0079-6123(08)01125-4
- Hernowo, A.T., Boucard, C.C., Jansonius, N.M., Hooymans, J.M.M., Cornelissen, F.W., 2011. Automated morphometry of the visual pathway in primary open-angle glaucoma. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 2758–2766. doi:10.1167/iovs.10-5682
- Howell, G.R., Libby, R.T., John, S.W.M., 2008. Mouse genetic models: an ideal system for understanding glaucomatous neurodegeneration and neuroprotection. *Prog. Brain Res.* doi:10.1016/S0079-6123(08)01122-9
- Howell, G.R., Soto, I., Zhu, X., Ryan, M., Macalinao, D.G., Sousa, G.L., Caddle, L.B., Macnicoll, K.H., Barbay, J.M., Porciatti, V., Anderson, M.G., Smith, R.S., Clark, A.F., Libby, R.T., John, S.W.M.,

2012. Radiation treatment inhibits monocyte entry into the optic nerve head and prevents neuronal damage in a mouse model of glaucoma. *J. Clin. Invest.* 122. doi:10.1172/JCI61135DS1
- Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 677–736. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.677
- Huang, P., Qi, Y., Xu, Y.-S., Liu, J., Liao, D., Zhang, S.S.-M., Zhang, C., 2010. Serum cytokine alteration is associated with optic neuropathy in human primary open angle glaucoma. *J. Glaucoma* 19, 324–30. doi:10.1097/IJG.0b013e3181b4cac7
- Huang, Y., Cen, L.-P., Choy, K.W., van Rooijen, N., Wang, N., Pang, C.P., Cui, Q., 2007. JAK/STAT pathway mediates retinal ganglion cell survival after acute ocular hypertension but not under normal conditions. *Exp. Eye Res.* 85, 684–95. doi:10.1016/j.exer.2007.08.003
- Hunt, D., Raivich, G., Anderson, P.N., 2012. Activating transcription factor 3 and the nervous system. *Front. Mol. Neurosci.* 5, 1–17. doi:10.3389/fnmol.2012.00007
- Iba-Zizen, M., Istoc, A., Cabanis, E., 2008. Que penser des résultats d'exploration par IRM des patients atteints de glaucome ? *J Fr. Ophtalmol* 24–28.
- Inman, D.M., Horner, P.J., 2007. Reactive nonproliferative gliosis predominates in a chronic mouse model of glaucoma. *Glia* 55, 942–953. doi:10.1002/glia.20516
- Inman, D.M., Sappington, R.M., Horner, P.J., Calkins, D.J., 2006. Quantitative correlation of optic nerve pathology with ocular pressure and corneal thickness in the DBA/2 mouse model of glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 986–96. doi:10.1167/iovs.05-0925
- Javitt, J.C., Wang, F., West, S.K., 1996. BLINDNESS DUE TO CATARACT : Epidemiology and Prevention. *Annu Rev. Public Heal.* 2010.
- John, S.W.M., Smith, R.S., Savinova, O. V, Hawes, N.L., Chang, B., Turnbull, D., Davisson, M., Roderick, T.H., Heckenlively, J.R., 1998. Essential Iris Atrophy, Pigment Dispersion, and Glaucoma in DBA/2J Mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*
- Johnson, E.C., Jia, L., Cepurna, W.O., Doser, T.A., Morrison, J.C., 2007. Global changes in optic nerve head gene expression after exposure to elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 3161–3177. doi:10.1167/iovs.06-1282
- Johnson, E.C., Morrison, J.C., 2009. Friend or Foe? Resolving the Impact of Glial Responses in Glaucoma. *J Glaucoma* 0, 341–353. doi:10.1097/IJG.0b013e31818c6ef6.Friend
- Jonas, J.B., 2011. Role of cerebrospinal fluid pressure in the pathogenesis of glaucoma. *Acta Ophthalmol.* doi:10.1111/j.1755-3768.2010.01915.x
- Jonas, J.B., Berenshtein, E., Holbach, L., 2003. Anatomic Relationship between Lamina Cribrosa, Intraocular Space, and Cerebrospinal Fluid Space. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 44, 5189. doi:10.1167/iovs.03-0174
- Kanamori, A., Nakamura, M., Nakanishi, Y., Yamada, Y., Negi, A., 2005. Long-term glial reactivity in rat retinas ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. *Exp. Eye Res.* 81, 48–56. doi:10.1016/j.exer.2005.01.012

- Kaneko, H., Nishiguchi, K.M., Nakamura, M., Kachi, S., Terasaki, H., 2008. Characteristics of bone marrow-derived microglia in the normal and injured retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 4162–8. doi:10.1167/iov.08-1738
- Kaplan, E., 2012. The M, P and K pathways of the Primate Visual System revisited. *New Vis. Neurosci.* (J.Werner L. Chalupa, Eds), MIT Press 215–226.
- Karlstetter, M., Ebert, S., Langmann, T., 2010. Microglia in the healthy and degenerating retina: insights from novel mouse models. *Immunobiology* 215, 685–91. doi:10.1016/j.imbio.2010.05.010
- Karlstetter, M., Scholz, R., Rutar, M., Wong, W.T., Provis, J.M., Langmann, T., 2014. Retinal Microglia: Just Bystander or Target for Therapy? *Prog. Retin. Eye Res.* doi:10.1016/j.preteyeres.2014.11.004
- Katome, T., Namekata, K., Guo, X., Semba, K., Kittaka, D., Kawamura, K., Kimura, a, Harada, C., Ichijo, H., Mitamura, Y., Harada, T., 2013. Inhibition of ASK1-p38 pathway prevents neural cell death following optic nerve injury. *Cell Death Differ.* 20, 270–80. doi:10.1038/cdd.2012.122
- Kerr, N.M., Johnson, C.S., Green, C.R., Danesh-Meyer, H. V., 2011. Gap junction protein connexin43 (GJA1) in the human glaucomatous optic nerve head and retina. *J. Clin. Neurosci.* 18, 102–8. doi:10.1016/j.jocn.2010.06.002
- Kierdorf, K., Erny, D., Goldmann, T., Sander, V., Schulz, C., Perdiguero, E.G., Wieghofer, P., Heinrich, A., Riemke, P., Hölscher, C., Müller, D.N., Luckow, B., Brocker, T., Debowski, K., Fritz, G., Opdenakker, G., Diefenbach, A., Biber, K., Heikenwalder, M., Geissmann, F., Rosenbauer, F., Prinz, M., 2013. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat. Neurosci.* 16, 273–80. doi:10.1038/nn.3318
- Kikuchi, M., Tenneti, L., Lipton, S.A., 2000. Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Axotomy-Induced Apoptosis of Rat Retinal Ganglion Cells 20, 5037–5044.
- Kim, K.S., Wass, C.A., Cross, A.S., Opal, S.M., 1992. Modulation of blood-brain barrier permeability by tumor necrosis factor and antibody to tumor necrosis factor in the rat. *Lymphokine Cytokine Res.* 11, 293–298.
- Ko, M.-L., Peng, P.-H., Ma, M.-C., Ritch, R., Chen, C.-F., 2005. Dynamic changes in reactive oxygen species and antioxidant levels in retinas in experimental glaucoma. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 365–73. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.03.025
- Ko, M.L., Hu, D.N., Ritch, R., Sharma, S.C., Chen, C.F., 2001. Patterns of retinal ganglion cell survival after brain-derived neurotrophic factor administration in hypertensive eyes of rats. *Neurosci. Lett.* 305, 139–42.
- Kuehn, M.H., Fingert, J.H., Kwon, Y.H., 2005. Retinal ganglion cell death in glaucoma: mechanisms and neuroprotective strategies. *Ophthalmol. Clin. North Am.* 18, 383–95, vi. doi:10.1016/j.ohc.2005.04.002
- Kupfer, C., Downer, C., 1967. Quantitative histology of optic nerve, optic tract and lateral geniculate nucleus of man \* 393–401.



- Kwon, Y.H., Fingert, J.H., Kuehn, M.H., Alward, W.L.M., 2009. Primary Open-Angle Glaucoma. *new Engl. J. Med. Rev.*
- Lam, D., Jim, J., To, E., Rasmussen, C., Kaufman, P.L., Matsubara, J., 2009a. Astrocyte and microglial activation in the lateral geniculate nucleus and visual cortex of glaucomatous and optic nerve transected primates. *Mol. Vis.* 15, 2217–2229.
- Lam, D., Jim, J., To, E., Rasmussen, C., Kaufman, P.L., Matsubara, J., 2009b. Astrocyte and microglial activation in the lateral geniculate nucleus and visual cortex of glaucomatous and optic nerve transected primates. *Mol. Vis.* 2217–2229.
- Lambiase, A., Aloe, L., Centofanti, M., Parisi, V., Mantelli, F., Colafrancesco, V., Luca, G., Gilberto, M., Bonini, S., Levi-montalcini, R., 2009. Experimental and clinical evidence of neuroprotection by nerve growth factor eye drops : Implications. *PNAS* 106, 13469–13474.
- Langmann, T., 2007. Microglia activation in retinal degeneration. *J. Leukoc. Biol.* 81, 1345–51. doi:10.1189/jlb.0207114
- Lasker/IRRF Initiative, 2010. Astrocytes and Glaucomatous Neurodegeneration.
- Le Gros Clark, W.E., 1941. The laminar organization and cell content of the lateral geniculate body in the monkey. *J. Anat.* 75, 419–433.
- Leaver, S.G., Cui, Q., Plant, G.W., Arulpragasam, A., Hisheh, S., Verhaagen, J., Harvey, A.R., 2006. AAV-mediated expression of CNTF promotes long-term survival and regeneration of adult rat retinal ganglion cells. *Gene Ther.* 13, 1328–1341. doi:10.1038/sj.gt.3302791
- Lehmann, J., Härtig, W., Seidel, a, Földner, C., Hobohm, C., Grosche, J., Krueger, M., Michalski, D., 2014. Inflammatory cell recruitment after experimental thromboembolic stroke in rats. *Neuroscience* 279, 139–54. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.08.023
- Levkovitch-Verbin, H., 2004. Animal models of optic nerve diseases. *Eye (Lond).* 18, 1066–74. doi:10.1038/sj.eye.6701576
- Levkovitch-Verbin, H., Quigley, H.A., Martin, K.R.G., Valenta, D., Baumrind, L.A., Pease, M.E., 2002. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 402–410.
- Li, C., Cai, P., Shi, L., Lin, Y., Zhang, J., Liu, S., Xie, B., Shi, Y., Yang, H., Li, S., Du, H., Wang, J., 2012. Voxel-based Morphometry of the Visual-related Cortex in Primary Open Angle Glaucoma. *Curr. Eye Res.* doi:10.3109/02713683.2012.683506
- Li, L., Eter, N., Heiduschka, P., 2015. The microglia in healthy and diseased retina. *Exp. Eye Res.* doi:10.1016/j.exer.2015.04.020
- Libby, R., Anderson, M., Pang, I., Robinson, Z., Savinova, O., Cosma, I., Snow, A., Wilson, L., Smith, R., Clark, A., John, S., 2005. Inherited glaucoma in DBA / 2J mice : pertinent disease features for studying the. *Vis. Neurosci.* 22, 16332275.
- Liu, B., Neufeld, A.H., 2000. Expression of Nitric Oxide Synthase-2 ( NOS-2 ) in Reactive Astrocytes of the Human Glaucomatous Optic. *Glia* 186, 178–186.

- Liu, M., Guo, L., Salt, T.E., Cordeiro, M.F., 2014. Dendritic changes in rat visual pathway associated with experimental ocular hypertension. *Curr. Eye Res.* 39, 953–63. doi:10.3109/02713683.2014.884594
- Livingstone, M., Hubel, D., 1988. Segregation of form, color, movement, and depth: anatomy, physiology, and perception. *Science* 240, 740–749. doi:10.1126/science.3283936
- Lobsiger, C.S., Cleveland, D.W., 2007. Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. *Nat. Neurosci.* 10, 1355–60. doi:10.1038/nn1988
- Lukasiewicz, P.D., 2005. Synaptic mechanisms that shape visual signaling at the inner retina. *Prog. Brain Res.* doi:10.1016/S0079-6123(04)47016-2
- Luo, C., Yang, X., Kain, A.D., Powell, D.W., Kuehn, M.H., Tezel, G., 2010. Glaucomatous tissue stress and the regulation of immune response through glial Toll-like receptor signaling. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 5697–707. doi:10.1167/iovs.10-5407
- Mackenzie, P., Cioffi, G., 2008. How does lowering of intraocular pressure protect the optic nerve? *Surv. Ophthalmol.* 53 Suppl1, S39–43. doi:10.1016/j.survophthal.2008.08.008
- Madigan, M.C., Sadun, A.A., Rao, N.S., Dugel, P.U., Tenhula, W.N., Gill, P.S., 1996. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced optic neuropathy in rabbits. *Neurol. Res.* 18, 176–184.
- Marek, B., Harris, A., Kanakamedala, P., Lee, E., Amireskandari, A., Carichino, L., Guidoboni, G., Tobe, L.A., Siesky, B., 2014. Cerebrospinal fluid pressure and glaucoma: regulation of trans-lamina cribrosa pressure. *Br. J. Ophthalmol.* 98, 721–725. doi:10.1136/bjophthalmol-2013-303884
- Marin, I., Kipnis, J., 2013. Learning and memory ... and the immune system. *Learn. Mem.* 20, 601–6. doi:10.1101/lm.028357.112
- May, P.J., 2006. The mammalian superior colliculus: laminar structure and connections. *Prog. Brain Res.* 151, 321–78. doi:10.1016/S0079-6123(05)51011-2
- Mayhan, W.G., 2002. Cellular mechanisms by which tumor necrosis factor- $\alpha$  produces disruption of the blood – brain barrier. *Brain Res.* 927, 144–152.
- Mead, B., Logan, A., Berry, M., Leadbeater, W., Scheven, B. a, 2013. Intravitreally transplanted dental pulp stem cells promote neuroprotection and axon regeneration of retinal ganglion cells after optic nerve injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 7544–56. doi:10.1167/iovs.13-13045
- Mi, X., Yuan, T., So, K., 2014. The current research status of normal tension glaucoma. *Clin. Interv. Aging* 1563–1571.
- Mitchell, P., Hourihan, F., Sandbach, J., Wang, J.J., 1999. The relationship between glaucoma and myopia: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 106, 2010–2015. doi:10.1016/S0161-6420(99)90416-5
- Mizutani, M., Pino, P. a, Saederup, N., Charo, I.F., Ransohoff, R.M., Cardona, A.E., 2012. The fractalkine receptor but not CCR2 is present on microglia from embryonic development throughout adulthood. *J. Immunol.* 188, 29–36. doi:10.4049/jimmunol.1100421

- Mogi, M., Harada, M., Riederer, P., Narabayashi, H., Fujita, K., Nagatsu, T., 1994. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci. Lett.* 165, 208–210. doi:10.1016/0304-3940(94)90746-3
- Moreno, M.C., Campanelli, J., Sande, P., Sáenz, D. a., Keller Sarmiento, M.I., Rosenstein, R.E., 2004. Retinal Oxidative Stress Induced by High Intraocular Pressure. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 803–812. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.001
- Morgan, J., Caprioli, J., Koseki, Y., 1999. Nitric oxide mediates excitotoxic and anoxic damage in rat retinal ganglion cells cocultured with astroglia. *Arch Ophthalmol* 117, 1524–1529.
- Morgan, J.E., 2000. Optic nerve head structure in glaucoma: astrocytes as mediators of axonal damage. *Eye (Lond)*. 14 ( Pt 3B, 437–444. doi:10.1038/eye.2000.128
- Morrison, J.C., Moore, C.G., Deppmeier, L.M., Gold, B.G., Meshul, C.K., Johnson, E.C., 1997. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp. Eye Res.* 64, 85–96. doi:10.1006/exer.1996.0184
- Moss, M.L., Jin, S.L., Milla, M.E., Bickett, D.M., Burkhart, W., Carter, H.L., Chen, W.J., Clay, W.C., Didsbury, J.R., Hassler, D., Hoffman, C.R., Kost, T.A., Lambert, M.H., Leesnitzer, M.A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L.K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J.L., Becherer, J.D., 1997. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385, 733–736. doi:10.1038/385733a0
- Mottet, B., Aptel, F., Romanet, J.-P., Hubanova, R., Pépin, J.-L., Chiquet, C., 2013. 24-Hour Intraocular Pressure Rhythm in Young Healthy Subjects Evaluated With Continuous Monitoring Using a Contact Lens Sensor. *JAMA Ophthalmol.* 131, 1507–16. doi:10.1001/jamaophthalmol.2013.5297
- Muller, M., Holländer, H., 1988. A small population of retinal ganglion cells projecting to the retina of the other eye. *Exp. Brain Res.* 611–617.
- Munoz, L., Ammit, A.J., 2010. Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* doi:10.1016/j.neuropharm.2009.11.010
- Mutter, L.J., Vrensen, G.F.J.M., Pels, L., Cardozo, B.N., Willekens, B., 1997. Architecture of Human Corneal Nerves. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 985–994.
- Nadal-Nicolás, F.M., Valiente-Soriano, F.J., Salinas-Navarro, M., Jiménez-López, M., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriuso, M., 2015. Retino-retinal projection in juvenile and young adult rats and mice. *Exp. Eye Res.* 134, 47–52. doi:10.1016/j.exer.2015.03.015
- Nakazawa, T., Nakazawa, C., Matsubara, A., Noda, K., Hisatomi, T., She, H., Michaud, N., Hafezi-Moghadam, A., Miller, J.W., Benowitz, L.I., 2006a. Tumor necrosis factor-alpha mediates oligodendrocyte death and delayed retinal ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *J. Neurosci.* 26, 12633–41. doi:10.1523/JNEUROSCI.2801-06.2006
- Nakazawa, T., Nakazawa, C., Matsubara, A., Noda, K., Hisatomi, T., She, H., Michaud, N., Hafezi-Moghadam, A., Miller, J.W., Benowitz, L.I., 2006b. Tumor necrosis factor-alpha mediates oligodendrocyte death and delayed retinal ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *J. Neurosci.* 26, 12633–41. doi:10.1523/JNEUROSCI.2801-06.2006

- Neels, J.G., Pandey, M., Hotamisligil, G.S., Samad, F., 2006. Autoamplification of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *Am. J. Pathol.* 168, 435–444. doi:10.2353/ajpath.2006.050699
- Neufeld, A.H., 1999. Microglia in the Optic Nerve Head and the Region of Parapapillary Chorioretinal Atrophy in Glaucoma 117, 1050–1056.
- Neufeld, A.H., Das, S., Vora, S., Gachie, E., Kawai, S.-I., Manning, P.T., Connor, J.R., 2002. A prodrug of a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase is neuroprotective in the rat model of glaucoma. *J. Glaucoma* 11, 221–225. doi:10.1097/00061198-200206000-00010
- Nickells, R.W., Howell, G.R., Soto, I., John, S.W.M., 2012. Under pressure: cellular and molecular responses during glaucoma, a common neurodegeneration with axonopathy. *Annu. Rev. Neurosci.* 35, 153–79. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135728
- Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Serebryiskaya, T., Zvereva, S., Sviridov, E., Dezso, Z., Rahkmatulin, E., Brennan, R.J., Yankovsky, N., Bhattacharya, S.K., Agapova, O., Hernandez, M.R., Shestopalov, V.I., 2009. Network analysis of human glaucomatous optic nerve head astrocytes. *BMC Med. Genomics* 2, 24. doi:10.1186/1755-8794-2-24
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F., 2005. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science* (80-. ). 308, 1314–1319.
- Nissirios, N., Chanis, R., Johnson, E., Morrison, J., Cepurna, W.O., Jia, L., Mittag, T., Danias, J., 2008. Comparison of anterior segment structures in two rat glaucoma models: An ultrasound biomicroscopic study. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 2478–2482. doi:10.1167/iovs.07-0965
- Paganelli, R., Di Iorio, A., Patricelli, L., Ripani, F., Sparvieri, E., Faricelli, R., Iarlori, C., Porreca, E., Di Gioacchino, M., Abate, G., 2002. Proinflammatory cytokines in sera of elderly patients with dementia: Levels in vascular injury are higher than those of mild-moderate Alzheimer's disease patients. *Exp. Gerontol.* 37, 257–263. doi:10.1016/S0531-5565(01)00191-7
- Paglinawan, R., Malipiero, U., Schlapbach, R., Frei, K., Reith, W., Fontana, A., 2003. TGF $\beta$  Directs Gene Expression of Activated Microglia to an Anti-Inflammatory Phenotype Strongly Focusing on Chemokine Genes and Cell Migratory Genes. *Glia* 44, 219–231. doi:10.1002/glia.10286
- Park, H., Lee, N., Kim, J., Park, C., 2008. Intraocular pressure lowering, change of antiapoptotic molecule expression, and neuroretinal changes by dorzolamide 2% / timolol 0.5% combination in a chronic. *J Ocul Pharmacol Ther.* 24, 563–71. doi:10.1089/jop.2008.0039
- Pasutto, F., Matsumoto, T., Mardin, C.Y., Sticht, H., Brandstätter, J.H., Michels-Rautenstrauss, K., Weisschuh, N., Gramer, E., Ramdas, W.D., van Koolwijk, L.M.E., Klaver, C.C.W., Vingerling, J.R., Weber, B.H.F., Kruse, F.E., Rautenstrauss, B., Barde, Y.A., Reis, A., 2009. Heterozygous NTF4 Mutations Impairing Neurotrophin-4 Signaling in Patients with Primary Open-Angle Glaucoma. *Am. J. Hum. Genet.* 85, 447–456. doi:10.1016/j.ajhg.2009.08.016
- Pease, M.E., McKinnon, S.J., Quigley, H.A., Kerrigan-Baumrind, L.A., Zack, D.J., 2000. Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 764–774.
- Pekny, M., Nilsson, M., 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50, 427–34. doi:10.1002/glia.20207

- Pena, J.D., Netland, P.A., Vidal, I., Dorr, D.A., Rasky, A., Hernandez, M.R., 1998. Elastosis of the lamina cribrosa in glaucomatous optic neuropathy. *Exp. Eye Res.* 67, 517–524. doi:10.1006/exer.1998.0539
- Perdiguero, E.G., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., Rodewald, H.-R., 2015. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518, 547–551. doi:10.1038/nature13989
- Perez, V.L., Saeed, a M., Tan, Y., Urbieto, M., Cruz-Guilloty, F., 2013. The eye: A window to the soul of the immune system. *J. Autoimmun.* 45, 7–14. doi:10.1016/j.jaut.2013.06.011
- Perry, V.H., Cowey, A., 1984. Retinal ganglion cells that project to the superior colliculus and pretectum in the macaque monkey. *Neuroscience* 12, 1125–1137. doi:10.1016/0306-4522(84)90007-1
- Pober, J.S., Bevilacqua, M.P., Mendrick, D.L., Lapierre, L.A., Fiers, W., Gimbrone, M.A., 1986. TWO DISTINCT MONOKINES , INTERLEUKIN 1 AND TUMOR NECROSIS FACTOR , EACH INDEPENDENTLY INDUCE BIOSYNTHESIS AND TRANSIENT EXPRESSION OF THE SAME ANTIGEN ON THE SURFACE OF CULTURED HUMAN VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS '. *J. Immunol.* 136, 1680–1687.
- Prasad, S., Galetta, S.L., 2011. *Anatomy and physiology of the afferent visual system.*, 1st ed, Handbook of clinical neurology. Elsevier B.V. doi:10.1016/B978-0-444-52903-9.00007-8
- Priebe, N.J., McGee, A.W., 2014. Mouse vision as a gateway for understanding how experience shapes neural circuits. *Front. Neural Circuits* 8, 123. doi:10.3389/fncir.2014.00123
- Probert, L., 2015. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience* 302, 2–22. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.06.038
- Quigley, H. a, Broman, a T., 2006. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br. J. Ophthalmol.* 90, 262–7. doi:10.1136/bjo.2005.081224
- Quigley, H.A., 2011. Glaucoma. *Lancet* 377, 1367–77. doi:10.1016/S0140-6736(10)61423-7
- Quigley, H.A., Addicks, E.M., 1981. Regional differences in the structure of the lamina cribrosa and their relation to glaucomatous optic nerve damage. *Arch. Ophthalmol.* 99, 137–143. doi:10.1001/archopht.1981.03930010139020
- Quigley, H.A., Addicks, E.M., Green, W.R., Maumenee, A.E., 1981. Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage. *Arch. Ophthalmol.* doi:10.1001/archopht.1981.03930010635009
- Quigley, H.A., Dorman-Pease, M.E., Brown, A.E., 1991. Quantitative study of collagen and elastin of the optic nerve head and sclera in human and experimental monkey glaucoma. *Curr. Eye Res.* 10, 877–888. doi:10.3109/02713689109013884
- Quigley, H.A., Hohman, R.M., Addicks, E.M., Massof, R.W., Green, W.R., 1983. Morphologic changes in the lamina cribrosa correlated with neural loss in open-angle glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.*

- Quigley, H.A., McKinnon, S.J., Zack, D.J., Pease, M.E., Kerrigan-Baumrind, L.A., Kerrigan, D.F., Mitchell, R.S., 2000. Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 3460–3466.
- Ransohoff, R.M., Brown, M.A., 2012. Innate immunity in the central nervous system. *J. Clin. Invest.* 122, 1164–71. doi:10.1172/JCI58644
- Reichenbach, A., Bringmann, A., 2013. New functions of Müller cells. *Glia* 61, 651–78. doi:10.1002/glia.22477
- Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., Gage, F.H., 1997. Reactive astrocytes : cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* (1997) 2236, 581–587.
- Roh, M., Zhang, Y., Murakami, Y., Thanos, A., Lee, S.C., Vavvas, D.G., Benowitz, L.I., Miller, J.W., 2012. Etanercept, a widely used inhibitor of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), prevents retinal ganglion cell loss in a rat model of glaucoma. *PLoS One* 7, e40065. doi:10.1371/journal.pone.0040065
- Rohen, J.W., Lütjen-Drecoll, E., Flügel, C., Meyer, M., Grierson, I., 1993. Ultrastructure of the trabecular meshwork in untreated cases of primary open-angle glaucoma (POAG). *Exp. Eye Res.* 56, 683–692. doi:S0014483583710857 [pii]
- Rojas, B., Gallego, B.I., Ramírez, A.I., Salazar, J.J., de Hoz, R., Valiente-Soriano, F.J., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., Triviño, A., Ramírez, J.M., 2014. Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers. *J. Neuroinflammation* 11, 133. doi:10.1186/1742-2094-11-133
- Rose, C.R., Ransom, B.R., 1997. Gap junctions equalize intracellular Na<sup>+</sup> concentration in astrocytes. *Glia* 20, 299–307. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199708)20:4<299::AID-GLIA3>3.0.CO;2-1
- Roubeix, C., Godefroy, D., Mias, C., Sapienza, A., Riancho, L., Degardin, J., Fradot, V., Ivkovic, I., Picaud, S., Sennlaub, F., Denoyer, A., Rostene, W., Sahel, J.A., Parsadaniantz, S.M., Brignole-Baudouin, F., Baudouin, C., 2015. Intraocular pressure reduction and neuroprotection conferred by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an animal model of glaucoma. *Stem Cell Res. Ther.* 6, 177. doi:10.1186/s13287-015-0168-0
- Rudnicka, A.R., Mt-Isa, S., Owen, C.G., Cook, D.G., Ashby, D., 2006. Variations in primary open-angle glaucoma prevalence by age, gender, and race: A Bayesian meta-analysis. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 4254–4261. doi:10.1167/iovs.06-0299
- Rumelt, S., 2011. GLAUCOMA - BASIC AND CLINICAL CONCEPTS.
- Rungger-Brandle, E., Leuenberger, M.P., 2008. Barrières Hémato-Oculaires. Société Française d'Ophtalmologie Pathologie.
- Sabio, G., Davis, R.J., 2014. TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin. Immunol.* 26, 237–45. doi:10.1016/j.smim.2014.02.009
- Saederup, N., Cardona, A.E., Croft, K., Mizutani, M., Coteleur, A.C., Tsou, C.-L., Ransohoff, R.M., Charo, I.F., 2010. Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells

in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice. *PLoS One* 5, e13693.  
doi:10.1371/journal.pone.0013693

- Salinas-Navarro, M., Alarcón-Martínez, L., Valiente-Soriano, F.J., Jiménez-López, M., Mayor-Torroglosa, S., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2010. Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp. Eye Res.* 90, 168–183. doi:10.1016/j.exer.2009.10.003
- Salinas-Navarro, M., Mayor-Torroglosa, S., Jiménez-López, M., Avilés-Trigueros, M., Holmes, T.M., Lund, R.D., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2009. A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res.* 49, 115–26. doi:10.1016/j.visres.2008.09.029
- Sappington, R.M., Carlson, B.J., Crish, S.D., Calkins, D.J., 2010. The microbead occlusion model: a paradigm for induced ocular hypertension in rats and mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 207–16. doi:10.1167/iovs.09-3947
- Sasaoka, M., Nakamura, K., Shimazawa, M., Ito, Y., Araie, M., Hara, H., 2008. Changes in visual fields and lateral geniculate nucleus in monkey laser-induced high intraocular pressure model. *Exp. Eye Res.* 86, 770–82. doi:10.1016/j.exer.2008.02.004
- Sauer, H., Oertel, W., 1994. PROGRESSIVE DEGENERATION OF NIGROSTRIATAL DOPAMINE NEURONS FOLLOWING INTRASTRIATAL TERMINAL LESIONS WITH 6-HYDROXYDOPAMINE : A COMBINED RETROGRADE TRACING AND STUDY IN THE RAT. *Neuroscience* 59, 401–415.
- Sawada, A., Neufeld, A.H., 1999. Confirmation of the rat model of chronic, moderately elevated intraocular pressure. *Exp. Eye Res.* 69, 525–531. doi:10.1006/exer.1999.0732
- Sawada, H., Fukuchi, T., Tanaka, T., Abe, H., 2010. Tumor necrosis factor-alpha concentrations in the aqueous humor of patients with glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 903–906. doi:10.1167/iovs.09-4247
- Sawada, M., Kondo, N., Suzumura, A., Marunouchi, T., 1989. Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res.* 491, 394–397. doi:10.1016/0006-8993(89)90078-4
- Sennlaub, F., Auvynet, C., Calippe, B., Lavalette, S., Poupel, L., Hu, S.J., Dominguez, E., Camelo, S., Levy, O., Guyon, E., Saederup, N., Charo, I.F., Rooijen, N. Van, Nandrot, E., Bourges, J.-L., Behar-Cohen, F., Sahel, J.-A., Guillonneau, X., Raoul, W., Combadiere, C., 2013. CCR2(+) monocytes infiltrate atrophic lesions in age-related macular disease and mediate photoreceptor degeneration in experimental subretinal inflammation in Cx3cr1 deficient mice. *EMBO Mol. Med.* 5, 1775–93. doi:10.1002/emmm.201302692
- Shareef, S., Garcia-Valenzuela, E., Salierno, A., Walsh, J., Sharma, S., 1995. Chronic Ocular Hypertension Following Episcleral Venous Occlusion in Rats. *Exp. Eye Res.* 379–382.
- Shareef, S., Sawada, A., Neufeld, A.H., 1999. Isoforms of nitric oxide synthase in the optic nerves of rat eyes with chronic moderately elevated intraocular pressure. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 2884–2891.
- Shepro, D., Morel, N.M., 1993. Pericyte physiology. *FASEB J.* 7, 1031–1038.

- Shi, C., Pamer, E.G., 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 762–74. doi:10.1038/nri3070
- Shields, M.B., 2008. Normal-tension glaucoma: is it different from primary open-angle glaucoma? *Curr. Opin. Ophthalmol.* 19, 85–88. doi:10.1097/ICU.0b013e3282f3919b
- Stein-Streilein, J., 2013. Mechanisms of immune privilege in the posterior eye. *Int. Rev. Immunol.* 32, 42–56. doi:10.3109/08830185.2012.740535
- Stein-Streilein, J., 2008. Immune regulation and the eye. *Trends Immunol.* 29, 548–54. doi:10.1016/j.it.2008.08.002
- Streilein, J.W., 2003. Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 879–89. doi:10.1038/nri1224
- Swaroop, A., Kim, D., Forrest, D., 2010. Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 563–76. doi:10.1038/nrn2880
- Tanihara, H., Hangai, M., Sawaguchi, S., Abe, H., Kageyama, M., Nakazawa, F., Shirasawa, E., Honda, Y., 1997. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the retina of primate eyes with experimental glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* 115, 752–756. doi:10.1001/archophth.1997.01100150754011
- Targownik, L.E., Bernstein, C.N., 2013. Infectious and malignant complications of TNF inhibitor therapy in IBD. *Am. J. Gastroenterol.* 108, 1835–42, quiz 1843. doi:10.1038/ajg.2013.294
- Taylor, a W., 2009. Ocular immune privilege. *Eye (Lond).* 23, 1885–9. doi:10.1038/eye.2008.382
- Terminology and guidelines for glaucoma, 4th Editio. ed, 2014. . European Glaucoma Society.
- Tezel, G., 2006. Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences. *Prog. Retin. Eye Res.* 25, 490–513. doi:10.1016/j.preteyeres.2006.07.003
- Tezel, G., Chauhan, B.C., Leblanc, R.P., Wax, M.B., 2003. Immunohistochemical Assessment of the Glial Mitogen- Activated Protein Kinase Activation in Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44. doi:10.1167/iops.02-1136
- Tezel, G., Li, L.Y., Patil, R. V, Wax, M.B., 2001. TNF- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  Receptor-1 in the Retina of Normal and Glaucomatous Eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*
- Tezel, G., Wax, M.B., 2000. Increased production of tumor necrosis factor- $\alpha$  by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* 20, 8693–8700.
- Tezel, G., Yang, X., 2004. Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, in vitro. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 4049–4059. doi:10.1167/iops.04-0490
- Tezel, G., Yang, X., Luo, C., Cai, J., Powell, D.W., 2012. An astrocyte-specific proteomic approach to inflammatory responses in experimental rat glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 4220–33. doi:10.1167/iops.11-9101



- Tezel, G., Yang, X., Yang, J., Wax, M.B., 2004. Role of tumor necrosis factor receptor-1 in the death of retinal ganglion cells following optic nerve crush injury in mice. *Brain Res.* 996, 202–212. doi:10.1016/j.brainres.2003.10.029
- Tham, Y.-C., Li, X., Wong, T.Y., Quigley, H. a, Aung, T., Cheng, C.-Y., 2014. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* 121, 2081–90. doi:10.1016/j.ophtha.2014.05.013
- Triviño, A., Ramírez, J.M., Salazar, J.J., Ramírez, A.I., García-Sánchez, J., 1996. Immunohistochemical study of human optic nerve head astroglia. *Vision Res.* 36, 2015–2028. doi:10.1016/0042-6989(95)00317-7
- Tsou, C., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S., Aslanian, A.M., Weisberg, S.P., Mack, M., Charo, I.F., 2007. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J. Clin. Invest.* 117, 2–9. doi:10.1172/JCI29919.902
- Tuccari, G., Trombetta, C., Giardinelli, M.M., Arena, F., Barresi, G., 1986. Distribution of glial fibrillary acidic protein in normal and gliotic human retina. *Basic Appl. Histochem.* 30, 425–432.
- Urcola, J.H., Hernández, M., Vecino, E., 2006. Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp. Eye Res.* 83, 429–37. doi:10.1016/j.exer.2006.01.025
- Urcola, J.H., Hernández, M., Vecino, E., 2006. Three experimental glaucoma models in rats: Comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp. Eye Res.* 83, 429–437. doi:10.1016/j.exer.2006.01.025
- Van Steenwinckel, J., Auvynet, C., Sapienza, A., Reaux-Le Goazigo, A., Combadière, C., Melik Parsadaniantz, S., 2014. Stromal cell-derived CCL2 drives neuropathic pain states through myeloid cell infiltration in injured nerve. *Brain. Behav. Immun.* doi:10.1016/j.bbi.2014.10.016
- Vecino, E., Rodriguez, F.D., Ruzafa, N., Pereiro, X., Sharma, S.C., 2015. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 1–39. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.06.003
- Vickers, J.C., Hof, P.R., Schumer, R.A., Wang, R.F., Podos, S.M., Morrison, J.H., 1997. Magnocellular and parvocellular visual pathways are both affected in a macaque monkey model of glaucoma. *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.* 239–243.
- Vidal, L., Díaz, F., Villena, A., Moreno, M., Campos, J.G., Vargas, I.P. d, 2006. Nitric oxide synthase in retina and optic nerve head of rat with increased intraocular pressure and effect of timolol. *Brain Res. Bull.* 70, 406–413. doi:10.1016/j.brainresbull.2006.07.009
- Vithana, E.N., Nongpiur, M.E., Venkataraman, D., Chan, S.H., Mavinahalli, J., Aung, T., 2010. Identification of a novel mutation in the NTF4 gene that causes primary open-angle glaucoma in a Chinese population. *Mol. Vis.* 16, 1640–1645.
- Walczak, H., 2011. TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. *Immunol. Rev.* doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01066.x
- Wang, K., Peng, B., Lin, B., 2014. Fractalkine receptor regulates microglial neurotoxicity in an experimental mouse glaucoma model. *Glia.* doi:10.1002/glia.22715

- Wang, L., Cioffi, G.A., Cull, G., Dong, J., Fortune, B., 2001. Immunohistologic Evidence for Retinal Glial Cell Changes in Human Glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1088–1094.
- Wang, M., Wong, W.T., 2014. Microglia-Müller Cell Interactions in the Retina. *Adv. Exp. Med. Biol.* 801, 333–338. doi:10.1007/978-1-4614-3209-8
- Wang, X., Tay, S.S., Ng, Y.K., 2000a. An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinae of rats with experimental glaucoma. *Exp. Brain Res.* 132, 476–84.
- Wang, X., Tay, S.S., Ng, Y.K., 2000b. An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinae of rats with experimental glaucoma. *Exp. brain Res.* 132, 476–484.
- Weber, A.J., Chen, H., Hubbard, W.C., Kaufman, P.L., 2000. Experimental Glaucoma and Cell Size, Density, and Number in the Primate Lateral Geniculate Nucleus. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 1370–1379.
- Weber, A.J., Zelenak, D., 2001. Experimental glaucoma in the primate induced by latex microspheres. *J. Neurosci. Methods* 111, 39–48. doi:10.1016/S0165-0270(01)00443-5
- Wilms, H., Rosenstiel, P., Sievers, J., Deuschl, G., Zecca, L., Lucius, R., 2003. Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. *FASEB J.* 17, 500–502. doi:10.1096/fj.02-0314fje
- Wolburg, H., Lippoldt, A., 2002. Tight junctions of the blood-brain barrier: Development, composition and regulation. *Vascul. Pharmacol.* doi:10.1016/S1537-1891(02)00200-8
- Wright, J.L., Merchant, R.E., 1994. Blood-brain barrier changes following intracerebral injection of human recombinant tumor necrosis factor-alpha in the rat. *J. Neurooncol.* 20, 17–25. doi:10.1007/BF01057957
- Wright, J.L., Merchant, R.E., 1992. Histopathological effects of intracerebral injections of human recombinant tumor necrosis factor-alpha in the rat. *Acta Neuropathol.* 85, 93–100. doi:10.1007/BF00304638
- Xu, H., Chen, M.E.I., Mayer, E.J., Forrester, J. V, Dick, A.D., 2007. Turnover of Resident Retinal Microglia in the Normal Adult Mouse. *Glia* 1198, 1189–1198. doi:10.1002/glia
- Yan, Q., Wang, J., Matheson, C.R., Urich, J.L., 1999. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) promotes the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats: comparison to and combination with brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *J. Neurobiol.* 38, 382–390.
- Yan, X., Tezel, G., Wax, M.B., Edward, D.P., 2000a. Matrix metalloproteinases and tumor necrosis factor alpha in glaucomatous optic nerve head. *Arch Ophthalmol* 118, 666–73.
- Yan, X., Tezel, G., Wax, M.B., Edward, D.P., 2000b. Matrix metalloproteinases and tumor necrosis factor alpha in glaucomatous optic nerve head. *Arch. Ophthalmol.* 118, 666–673.
- Yang, X., Luo, C., Cai, J., Powell, D.W., Yu, D., Kuehn, M.H., Tezel, G., 2011. Neurodegenerative and inflammatory pathway components linked to TNF- $\alpha$ /TNFR1 signaling in the glaucomatous human retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 8442–54. doi:10.1167/iov.11-8152

- Yu, D.-Y., Cringle, S.J., Balaratnasingam, C., Morgan, W.H., Yu, P.K., Su, E.-N., 2013. Retinal ganglion cells: Energetics, compartmentation, axonal transport, cytoskeletons and vulnerability. *Prog. Retin. Eye Res.* 36, 217–46. doi:10.1016/j.preteyeres.2013.07.001
- Yu, L., Xie, L., Dai, C., Xie, B., Liang, M., Zhao, L., Yin, X., Wang, J., 2015. Progressive thinning of visual cortex in primary open-angle glaucoma of varying severity. *PLoS One* 10, e0121960. doi:10.1371/journal.pone.0121960
- Yuan, L., Neufeld, A., 2001. Activated microglia in the human glaucomatous optic nerve head. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 523–32.
- Yuan, L., Neufeld, A.H., 2000. Tumor necrosis factor-alpha: A potentially neurodestructive cytokine produced by glia in the human glaucomatous optic nerve head. *Glia* 32, 42–50. doi:10.1002/1098-1136(200010)32:1<42::AID-GLIA40>3.0.CO;2-3
- Yücel, Y.H., Zhang, Q., Gupta, N., Kaufman, P.L., Weinreb, R.N., 2000. Loss of Neurons in Magnocellular and Parvocellular Layers of the Lateral Geniculate Nucleus in Glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 118, 378–384.
- Yücel, Y.H., Zhang, Q., Weinreb, R.N., Kaufman, P.L., 2001. Atrophy of Relay Neurons in Magnocellular and Parvocellular Layers in the Lateral Geniculate Nucleus in Experimental Glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 3216–3222.
- Zhang, S., Wang, H., Lu, Q., Qing, G., Wang, N., Wang, Y., Li, S., Yang, D., Yan, F., 2009. Detection of early neuron degeneration and accompanying glial responses in the visual pathway in a rat model of acute intraocular hypertension. *Brain Res.* 1303, 131–143. doi:10.1016/j.brainres.2009.09.029
- Zikou, A.K., Kitsos, G., Tzarouchi, L.C., Astrakas, L., Alexiou, G.A., Argyropoulou, M.I., 2012. Voxel-based morphometry and diffusion tensor imaging of the optic pathway in primary open-angle glaucoma: a preliminary study. *AJNR. Am. J. Neuroradiol.* 33, 128–134. doi:10.3174/ajnr.A2714