



HAL
open science

Rôle de l'interleukine - 1 bêta dans la dégénérescence des photorécepteurs associée à la dégénérescence maculaire liée à l'âge

Hugo Charles-Messance

► **To cite this version:**

Hugo Charles-Messance. Rôle de l'interleukine - 1 bêta dans la dégénérescence des photorécepteurs associée à la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Physiologie [q-bio.TO]. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS047 . tel-02132148

HAL Id: tel-02132148

<https://theses.hal.science/tel-02132148>

Submitted on 16 May 2019

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale 394 : Physiologie, Physiopathologie & Thérapeutique
Institut de la Vision

Rôle de l'interleukine - 1 β dans la dégénérescence des photorécepteurs associée à la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age

Présentée par

Hugo CHARLES-MESSANCE

Thèse de Doctorat

Présentée et soutenue publiquement le lundi 26 mars 2018

Jury

Pr Isabelle AUDDO
Dr Etienne AUDINAT
Dr Stéphane HUNOT
Dr Sarah DOYLE
Dr Muriel PERRON
Pr Ramin TADAYONI
Dr Xavier GUILLONNEAU

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Directeur de Thèse
Encadrant

Il n'est pas question de livrer le monde aux assassins d'aube.
Aimé Césaire

Remerciements

En tout premier lieu, je tiens à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer cette thèse. Je remercie très sincèrement M. Etienne Audinat ainsi que M. Stéphane Hunot, pour avoir consacré un temps précieux à la relecture de ce manuscrit en temps que rapporteurs. Mes plus sincères remerciements à Mme Isabelle Audo, qui m'a fait l'honneur d'être présidente de ce jury. Merci infiniment à Mme Sarah Doyle et Mme Muriel Perron, pour avoir rempli le rôle d'examinatrices.

Je tiens évidemment à remercier M. José-Alain Sahel, pour m'avoir accueilli au sein de l'Institut de la Vision pendant ces quelques années, et pour m'avoir offert l'opportunité d'accomplir ma thèse dans un cadre de travail aussi privilégié.

Un très grand merci aux chefs de l'équipe S14. A Ramin bien sûr, mon directeur de thèse, pour m'avoir fait confiance, et avoir toujours réagi rapidement quand j'avais besoin de lui, malgré son emploi du temps de ministre. A Xavier, qui a été présent d'un bout à l'autre de cette thèse, et même un peu au-delà, auprès de qui j'ai beaucoup appris, qui s'est toujours montré disponible, de bonne humeur et optimiste : merci pour tous ces bons souvenirs, et pour avoir su rester calme, surtout dans les instants où je perdais les pédales parce que plus rien n'avait de sens ! A Florian, qui est un vrai moteur de recherche bibliographique à lui tout seul, et qui a toujours répondu présent quand j'avais des questions, ou émis des suggestions pertinentes - quand j'avais le courage de toquer à sa porte. Et à Michel, que je n'oublie pas, et qu'on est toujours heureux de retrouver aux réunions d'équipe pour écouter ses conseils ou découvrir ce qu'il a à présenter.

A mes amis, ma famille, mes parents, mes frères et ma petite sœur, mes (très) nombreux cousins, au premier ou au second degré, proches ou éloignés, à mes oncles et tantes, à ma grand-mère bien sûr, et ceux qui nous ont quittés, merci d'avoir toujours cru en moi, d'avoir partagé vos connaissances, vos souvenirs et votre savoir, si ce n'est scientifique au moins humain, et d'avoir fait de moi la personne que je suis (c'est un peu la faute de tout le monde, du coup).

Il m'est évidemment impossible de mentionner mes proches sans adresser un mot spécifique à Edouard, qui m'a toléré au quotidien pendant plusieurs années avec la patience d'un saint, et suffisamment de sagesse pour refaire le monde tous les soirs avec moi ; et à Pauline, qui n'est pas en reste, parce qu'elle aussi en a eu pour son argent. Continuez de vous accrocher : le meilleur reste à venir.

A mes potes de galère, collègues de master, et doctorants-compagnons de souffrance. Merci Sigy de nous avoir poussés en thèse, de nous avoir permis de surveiller avec autant d'assiduité notre glycémie, et d'avoir toujours su trouver la tonalité musicale pour nous accompagner dans la vie. Merci Axou d'avoir toujours su nous rappeler notre

place dans l'Univers, afin de prendre un peu de distance sur nos problèmes, et pour ta vision et ton optimisme légendaires. Merci Milou, pour nous avoir rappelé que l'herbe n'est pas toujours plus verte chez le voisin, mais qu'avec une bonne dose de motivation, on peut tout surmonter.

Et aux survivants de nos plus belles années : à Baleineau, huile des rouages de notre succès ; à Chloé, qui est allée jusqu'en Afrique à force de chercher sa station de taxi, et à Valentin, notre futur président, socialiste quand ça l'arrange : merci, vous êtes jolis, que l'empreinte de nos fesses luise éternellement sur les fauteuils de la BU, et que l'éclat de nos rires hantent pendant encore longtemps les couloirs de l'UPMC.

Et à ma Lucie, bien sûr : de Springfield à Beyrouth, de Dublin à Bournemouth, on se retrouvera toujours !

Un grand merci aux membres de mon bureau, avec qui il a toujours été si simple d'entretenir une si bonne dynamique. A Adeline & Célia, qui sont parties effectuer leur post-doc outre-Atlantique, mais dont les bonnes paroles résonnent toujours dans ma tête. A Ying, qui n'est pas partie bien loin, mais qui a laissé un souvenir pérenne dans notre bureau. Et à Ophélie, qui m'a formé, presque élevé : ça a été un plaisir terrifiant de travailler avec toi, merci pour tout ce que tu m'as transmis !

A mon voisin de bureau bien sûr, qui a été présent à mes côtés, physiquement mais surtout spirituellement, pendant trois ans, des « vendredi philosophie » aux formations qui ont changé nos vies, Arthur, qui n'a pas si souvent douté de ma bonne santé mentale. A Diane, qui avait fait de grands progrès en français, mais qui est partie trop tôt : qui sait, peut-être qu'un jour je te retrouverai en Californie ? Et à Abdallah, qui me fera toujours rire avec ses aventures : merci pour tes conseils avisés !

Un très très grand merci à toute notre équipe S14, la plus diversifiée, la plus tolérante, la plus marrante, la plus atypique, la plus énergique. A Fanny, que j'ai attendue, attendue, mais quand elle est arrivée, je n'ai pas été déçu ! On s'est suivis jusqu'au Texas, et à la Nouvelle-Orléans ; le destin nous sépare provisoirement, mais ce n'est que partie remise ! Profite des étendues glacées du Canada, et reviens-nous avec toujours autant de bonne humeur. A Chiara, pour son entrain, et son expertise incomparable dans le L2 ! ; à Sara, qu'on est toujours sûrs de croiser la nuit au détour d'un couloir obscur ; à Guillaume, qui a repris le flambeau de l'épopée mexicaine ; à Sébastien, qui répond toujours présent, je te souhaite bon courage pour ce qui t'attend ; à Aude, avec qui j'ai toujours pris grand plaisir à travailler, et qui m'a appris la rigueur, notamment à ne pas faire de bulles ; à Jean-Baptiste, à qui je dois probablement une clope ; à Lucile, pour ton aide, tes remarques critiques et tes trucs et astuces : j'espère être assez armé pour survivre en terrain hostile ; à Christophe, que j'aurais aimé voir rejoindre notre équipe plus tôt, à Wassila ; avec toi, je suis sûr de laisser le labo entre de bonnes mains, mais n'hésite pas à insister plus fermement pour imposer de nouvelles règles à toute

l'équipe : ils en ont besoin, ils sont juste trop timides pour l'avouer ; à Nour et Laurane, qui ont été des stagiaires excellentes !

Et à tous les anciens S14 qui ont fait leur temps, mais qu'on retrouvera toujours avec plaisir au coin d'une table dans un café – ou une bière à la main.

Aux membres de toutes les autres équipes scientifiques de l'institut, mes collègues ou mes amis, bien trop nombreux pour être tous cités ici, je vous remercie pour votre aide, votre patience, et votre collaboration ! Merci tout particulièrement à Valérie pour m'avoir toujours aidé avec le sourire, et à Stéphane aussi, même si entre nous, tu surestimes probablement mes compétences en microscopie. Merci à Vanessa, Quénol, Manu, Julie, pour m'avoir toujours couvert à l'animalerie. Merci aux vaillants cinéphiles, qui trouvèrent de tout temps le courage d'expérimenter avec moi. Je tiens aussi à remercier tous les autres membres du personnel technique de l'institut, de l'animalerie, de l'administration, du service de laverie et des différentes plateformes : merci pour votre bonne humeur, votre gentillesse, et votre assistance, pour nous aider à faire face aux situations auxquelles nous sommes confrontés tous les jours.

A mes compères de Mexico, Dra. Cécilia, Mayram, Océlotl, Sandra, Cesar, Ale, Yonathan, Gibran, Yolo, Ame, Sofia : merci d'avoir rendu mes séjours si faciles et si agréables, chacun d'entre eux est resté gravé en moi.

Et ceux pour lesquels je n'ai pas les mots. Merci à toi Anna, pour avoir patiemment partagé tous ces bons moments avec moi, le jour ou la nuit, qu'il pleuve ou qu'il neige. Tu es une excellente scientifique, ne te laisse pas distraire de ta voie. Un grand, grand merci à Alvaro, à vous qui m'avez fait mordre à l'hameçon il y a 5 ans : je vous dois tout, et notamment - n'ayons pas peur des mots - mon excellent niveau d'espagnol. A ma Lulu évidemment, que je n'ai pas vue depuis si longtemps, mais qui accompagne mes pensées avec nostalgie à chaque fois que je dissèque des explants. J'attends ton retour avec impatience, and beware the flat people ! A Marie, à qui je dois beaucoup, énormément, fichtrement, moultement ! Je n'ai pas besoin de m'étendre sur des pages et des pages pour te faire savoir à quel point tu comptes pour moi, et même si j'avais les mots, ce serait péché que de les écrire.

Et enfin, merci à toi, mon irréductible Gaël.

—

Il est maintenant temps de passer aux choses sérieuses - même si pour la plupart d'entre vous, la lecture s'arrête ici.

Table des matières

INTRODUCTION	12
I) L'œil et la rétine	13
1.1) Organisation générale de l'œil	13
1.1.1) Généralités	13
1.1.2) Les trois tuniques de l'œil	13
1.1.3) Organisation antéro-postérieure de l'œil	14
1.1.3.1) Le segment antérieur	14
1.1.3.2) Le segment postérieur	16
1.2) La rétine	16
1.2.1) Structure & particularités	16
1.2.1.1) Fonction	16
1.2.1.2) Organisation antéro-postérieure rétinienne	16
1.2.1.3) Organisation centre-périphérie : macula et fovéa	18
1.2.2) Histologie de la rétine	18
1.2.2.1) La rétine pigmentaire	18
1.2.2.2) La rétine neurosensorielle	21
1.2.2.2.1) Les neurones	21
1.2.2.2.1.1) Les photorécepteurs	21
1.2.2.2.1.2) Les autres neurones rétinien	23
1.2.2.2.2) Les cellules gliales de la rétine	24
1.2.2.2.3.1) Les cellules macrogliales	24
1.2.2.2.3.2) Les microglies résidentes	26
1.2.2.3) Le réseau vasculaire rétinien	27
1.2.3) Le privilège immun	28
1.2.3.1) Barrière hémato-rétinienne	28
1.2.3.2) Immunosuppression	29
1.3) Pathologies les plus fréquentes de la rétine	30
1.3.1) La rétinopathie diabétique	30
1.3.2) La rétinite pigmentaire	31
1.3.3) DMLA	31
II) DMLA & inflammation	32
2.1) Physiopathologie de la DMLA	32
2.1.1) La maculopathie liée à l'âge	32
2.1.2) Les formes tardives de la DMLA	32
2.1.2.1) Forme sèche	32
2.1.2.2) Forme humide	33
2.2) Caractéristiques de la DMLA	33
2.2.1) Statistiques épidémiologiques	33
2.2.2) Caractéristiques et symptômes	35
2.2.3) Les facteurs de risque	36
2.2.3.1) Les facteurs de risque avérés en lien avec l'inflammation	37
2.2.3.2) Les facteurs de risque environnementaux	38
2.2.4) Traitements	39
2.3) Inflammation dans la DMLA	40
2.3.1) Le système des phagocytes mononucléés	40

2.3.1.1) Progéniteurs, monocytes et macrophages	40
2.3.1.1.1) Origine des monocytes.....	40
2.3.1.1.2) Les monocytes.....	42
2.3.1.1.3) Les macrophages.....	44
2.3.1.2) Accumulation chronique des macrophages dans la DMLA.....	44
2.3.1.2.1) Les origines de l'inflammation chronique	44
2.3.1.2.2) Le recrutement des macrophages.....	45
2.3.2) Rôles des facteurs de risques génétiques	46
2.3.2.1) Apolipoprotéine E	46
2.3.2.2) Facteur H du Complément.....	48
2.3.2.3) ARMS2/HTRA1	49
2.3.3) Patho-mécanismes induits par les cytokines inflammatoires.....	50
2.3.3.1) IL-1 β	50
2.3.3.2) TNF- α	51
2.3.3.3) IL-6.....	52
III) Neuro-immunité de la DMLA atrophique.....	53
3.1) Dégénérescence de l'EPR.....	53
3.1.1) Généralités.....	53
3.1.2) Impact du stress oxydant sur l'EPR.....	53
3.1.3) Impact des cytokines inflammatoires, et notamment de l'IL-1 β	54
3.2) Toxicité neuronale induite par les cytokines inflammatoires.....	56
3.2.1) Glutamate	56
3.2.1.1) Généralités sur le glutamate.....	56
3.2.1.1.1) Le cycle du glutamate	56
3.2.1.1.1.1) Transporteurs du glutamate.....	57
3.2.1.1.1.1.1) EAATs.....	57
3.2.1.1.1.1.2) Le système x _c ⁻	59
3.2.1.1.1.2) Müller et photorécepteurs.....	61
3.2.1.1.2) Les récepteurs au glutamate	62
3.2.1.1.2.1) Les récepteurs ionotropiques	63
3.2.1.1.2.2) Les récepteurs métabotropiques.....	64
3.2.1.1.2.3) Les photorécepteurs expriment les récepteurs au glutamate.....	64
3.2.1.2) Toxicité du glutamate	65
3.2.1.2.1) Excitotoxicité du glutamate	66
3.2.1.2.1.1) Définition	66
3.2.1.2.1.2) Les acteurs moléculaires	66
3.2.1.2.1.3) Pathologies liées à l'excitotoxicité	68
3.2.1.2.2) Oxytose et système x _c ⁻	70
3.2.1.2.2.1) Stress oxydant	70
3.2.1.2.2.2) Métabolisme du glutathion.....	71
3.2.1.2.2.3) Oxytose.....	71
3.2.1.3) La production d'IL-1 β induit indirectement la mort neuronale.....	73
3.2.2) Les communications cellulaires rétiniennes.....	75
3.2.2.1) Interactions neuro-gliales rétiniennes.....	75
3.2.2.1.1) Homéostasie du glutamate.....	75
3.2.2.1.2) Les facteurs trophiques	75
3.2.2.2) Interactions entre microglies et cellules de Müller.....	76

OBJECTIFS	78
RESULTATS	81
Article 1 : Les phagocytes mononucléés sous-rétiniens induisent la perte des segments des cônes via IL-1 beta :	82
Article 2 : La production d'IL-1β par les phagocytes mononucléés sous-rétiniens induit la dégénérescence des bâtonnets en dérégulant l'homéostasie rétinienne du glutamate :	100
DISCUSSION & PERSPECTIVES	130
1) Résumé des résultats de la thèse.....	131
2) Considérations générales sur la persistance sous-rétinienne des macrophages	131
2.1) Les polymorphismes génétiques	132
2.2) Exposition à la lumière.....	132
2.3) Stress oxydant.....	133
2.4) Obésité & inflammation systémique.....	133
3) Perspectives thérapeutiques.....	134
3.1) Inhibition des récepteurs au glutamate	134
3.2) Inhibition du système x_c^-	135
3.3) Inhibition du stress oxydant induit par l'excitotoxicité.....	136
3.4) Mode d'application	136
BIBLIOGRAPHIE.....	138
ANNEXES.....	174
Table des illustrations.....	175
Articles complémentaires.....	177

Liste des abréviations

AG – Atrophie géographique
AMPA – α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate
APOE – Apolipoprotéine E
AREs – Adenylate-uridylate-rich elements
ASCT1/2 – Alanine, serine, cysteine transporter 1/2
ATP – Adénosine triphosphate
BDNF – Brain-derived neurotrophic factor
CD – Cellule dendritique
CNQX – 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CNTF – Ciliary neurotrophic factor
BHE – Barrière hémato-encéphalique
BHR – Barrière hémato-rétinienne
CCL2/CCR2 – Chemokine (C-C motif) ligand/receptor 2
CX3CL1/CX3CR1 – Chemokine (C-X3-C motif) ligand/receptor 1
DAMPs – Damage-associated molecular pattern
DMLA – Dégénérescence maculaire liée à l'âge
EAAC1 – Excitatory Amino Acid Carrier-1
EAATs – Excitatory Amino Acid Transporter
EPR – Épithélium pigmentaire rétinien
FasL – Fas-ligand
FDA – Food and Drug Administration
GABA – Acide γ -aminobutyrique
GCL – Glutamate cystéine ligase
GDNF – Glial cell line-derived neurotrophic factor
GLAST – Glutamate/aspartate transporter
GLT-1 – Glutamate transporter-1
GPx4 – Glutathione peroxidase 4
GS – Glutamine Synthétase
GSH – Glutathion
IIRC – Cluster de récepteurs liés à l'immunité innée
ISR – Réponse cellulaire intégrée au stress
IL-1 β – Interleukine-1 β
IL-1RI – Interleukine-1 receptor I
IL-6 – Interleukine-6
LPS – Lipopolysaccharide
MLA – Maculopathie liée à l'âge
NBQX – 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzolquinoxaline-2,3-dione
NGF – Nerve growth factor
NLRP3 – NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NMDA – N-methyl-D-aspartate
NO – Monoxyde d'azote

n/eNOS – Neural/endothelial nitric oxide synthase
Nrf2 – Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
OCT – Optical coherence tomography
OTX2 – Orthodenticle homeobox 2
PAMPs – Pathogen-associated molecular pattern
PDT – Thérapie photo-dynamique
PEDF – Pigment epithelium-derived factor
PMs – Phagocytes mononucléés
RD – Rétinopathie diabétique
RdCVF – Rod-derived cone viability factor
RDH5 – Retinol dehydrogenase 5
RNS – Reactive nitrogen species
ROS – Reactive oxygen species
RP – Rétinite pigmentaire
SNC – Système nerveux central
TGF- β – Transforming growth factor- β
TLR2/4 – Toll-like receptor 2/4
TNF- α – Tumor necrosis factor- α
TrkA/B – Tropomyosin receptor kinase A/B
TSP-1 – Thrombospondine-1
VEGF – Vascular endothelial growth factor
VGLUT – Vesicular glutamate transporter

INTRODUCTION

I) L'œil et la rétine

1.1) Organisation générale de l'œil

1.1.1) Généralités

L'œil est un organe du système visuel, dont la fonction est de réceptionner l'information visuelle, et de la convertir en signaux interprétables par le cerveau, favorisant ainsi l'interaction avec l'environnement. Dans le monde du vivant, on recense plusieurs dizaines de types d'organes visuels, présentant plus ou moins de caractéristiques communes. L'œil des mammifères, tels que l'homme ou la souris, est un œil dit « caméculaire », c'est-à-dire qu'il possède une cavité qui sépare la lentille convergente de l'œil – ou cristallin - de la rétine. L'œil est une structure extrêmement développée, permettant la perception des couleurs, des mouvements, des textures et des formes. Pour saisir la complexité de l'organisation oculaire, il faut considérer et confronter deux approches anatomiques : l'organisation antéro-postérieure de l'œil, ainsi que l'étude des différentes tuniques qui le composent.

1.1.2) Les trois tuniques de l'œil

L'œil est structuré à partir de trois tuniques qui constituent sa paroi : une tunique fibreuse, une tunique vasculaire, et une tunique interne ou rétine (Figure 1).

La tunique fibreuse est la plus périphérique. C'est un tissu souple et résistant, assez peu vascularisé, dont on peut identifier deux segments : (i) la sclère, qui correspond au blanc de l'œil et fournit une accroche aux muscles oculaires, et (ii) la cornée, un tissu transparent situé en position antérieure, protégeant l'œil des agressions physiques et bactériennes.

En dessous, on retrouve la tunique vasculaire ou uvée, qui est composée de trois éléments : (i) la choroïde assurant un support nutritif au tissu rétinien, (ii) les corps ciliaires, et (iii) l'iris.

Enfin, la tunique la plus interne ou rétine, a la particularité d'être confinée au segment postérieur de l'œil, et est directement responsable de la réception des signaux lumineux, et de leur transformation en signaux électriques, interprétables par le cerveau.

Pour mieux se représenter la structure anatomique du bulbe oculaire et identifier les fonctions des différents tissus qui le composent, il est plus intuitif de présenter son organisation spatiale selon un axe antéro-postérieur.

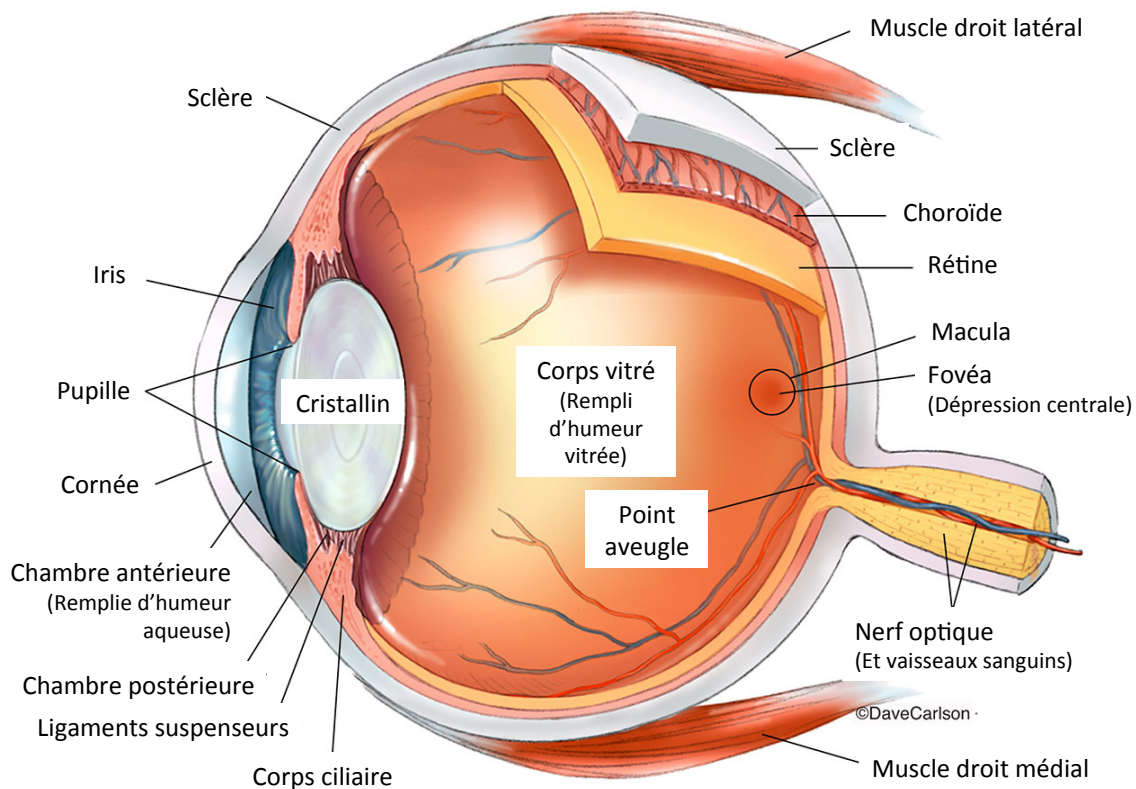


Figure 1 : Anatomie de l'œil humain en coupe transversale.

(©Dave Carlson / CarlsonStockArt.com)

1.1.3) Organisation antéro-postérieure de l'œil

1.1.3.1) Le segment antérieur

L'œil, ou bulbe oculaire, est une structure creuse, avec une forme sphérique légèrement irrégulière. Cette irrégularité est due à un léger renforcement saillant au pôle le plus antérieur de l'œil, qui correspond à la cornée (Figure 1).

La cornée est l'un des très rares tissus à ne pas être vascularisés, afin de ne pas perturber l'entrée de la lumière dans l'œil, et de jouer correctement son rôle de lentille convergente. La cornée survit donc grâce à la diffusion de l'oxygène et des nutriments essentiels à sa survie. L'oxygène provient du liquide lacrymal sécrété à l'extérieur de l'œil, et les nutriments diffusent eux à partir de l'humeur aqueuse. Ce liquide biologique, produit par les procès ciliaires, baigne la chambre antérieure de l'œil, participant de surcroît au maintien de la pression intraoculaire.

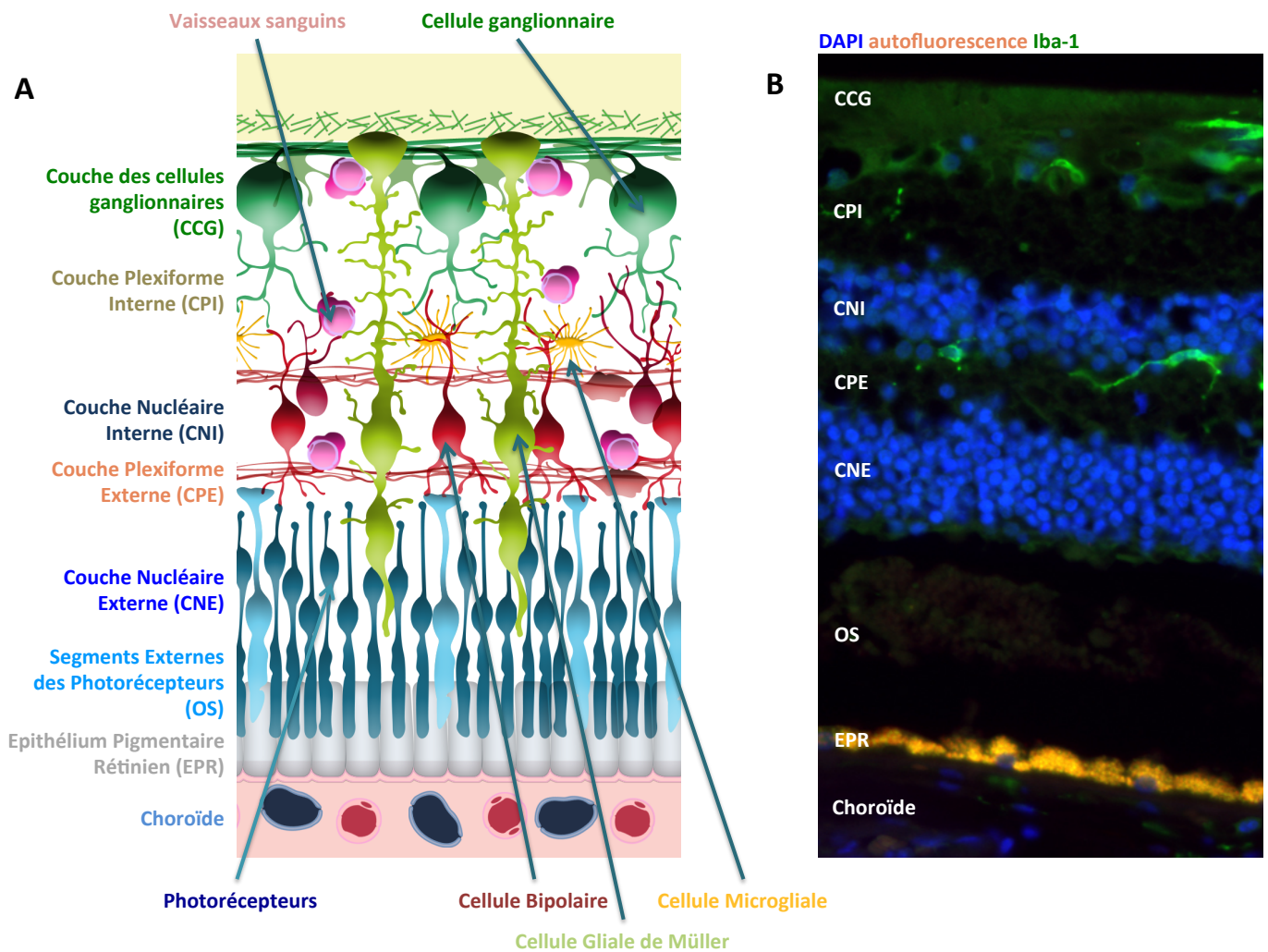


Figure 2 : Anatomie de la rétine en coupe sagittale. (A) Schéma représentant l'organisation de la rétine suivant la disposition des couches qui la composent. La position des différents types cellulaires est représentée à l'aide de flèches. (B) Coupe histologique d'une rétine humaine : les noyaux sont marqués au DAPI (En bleu), les microglies par l'anticorps anti-Iba1 (En vert), et l'EPR auto-fluorescent est représenté en orange.

Dans le segment antérieur de l'œil, entre la cornée et le cristallin, se trouve l'iris. L'iris est un diaphragme musculaire dont la contraction et la dilatation permettent de juguler la quantité de lumière qui traverse la pupille pour aller stimuler la rétine.

La face postérieure du cristallin délimite la séparation entre les segments antérieurs et postérieurs oculaires. Il s'agit de la deuxième lentille convergente de l'œil : le cristallin peut se contracter et ainsi concentrer l'intensité lumineuse sur la rétine, favorisant la perception d'une image nette, même pour un objet très proche de la surface de l'œil – avec une certaine limite. C'est ce qu'on appelle le phénomène d'accommodation.

1.1.3.2) Le segment postérieur

La segment postérieur, bien que supérieur au segment antérieur en terme de volume, présente une organisation anatomique *stricto sensu* plus simple. L'ensemble de cette cavité est occupé par le corps vitré, et ses parois sont tapissées par le tissu nerveux rétinien (Figure 1).

Chez l'homme, le volume du corps vitré est considérable, puisqu'il correspond à 90% du volume oculaire. De même que l'humeur aqueuse dans le segment antérieur de l'œil, le vitré permet de maintenir la pression intraoculaire : la présence de vitré permet aussi de plaquer la rétine à la paroi de l'œil, afin d'en prévenir le décollement, mais sans y adhérer – sauf au niveau du nerf optique. Le corps vitré est une substance gélatineuse transparente majoritairement composée d'eau, et dépourvue de vaisseaux sanguins, afin de favoriser au même titre que la cornée le passage de la lumière. Notons également la présence de hyalocytes, cellules synthétisant certains composés fibreux, comme le collagène ou l'acide hyaluronique.

1.2) La rétine

1.2.1) Structure & particularités

1.2.1.1) Fonction

Après avoir traversé les différentes structures qui composent l'œil, la lumière atteint les segments externes des photorécepteurs et active un mécanisme électrochimique appelé photo-transduction, qui permet de convertir l'information lumineuse en signaux électriques. Ces signaux se propagent dans l'épaisseur de la rétine, *via* les cellules bipolaires puis les cellules ganglionnaires pour ensuite rejoindre les aires visuelles du cerveau. L'intégration de ces signaux est modulée grâce à un système complexe d'interactions neuronales, permettant la formation d'une image précise au niveau du cortex visuel.

1.2.1.2) Organisation antéro-postérieure rétinienne

La rétine est le tissu nerveux directement responsable de la réception et de la conversion de l'information lumineuse en signaux électriques. Elle présente une organisation stratifiée, avec trois couches nucléaires séparées par deux couches plexiformes intermédiaires. La partie de la rétine en contact avec le corps vitré - vers le centre de l'œil - correspond à la rétine interne, et la partie en contact avec l'épithélium pigmentaire est la rétine externe (Figure 2).

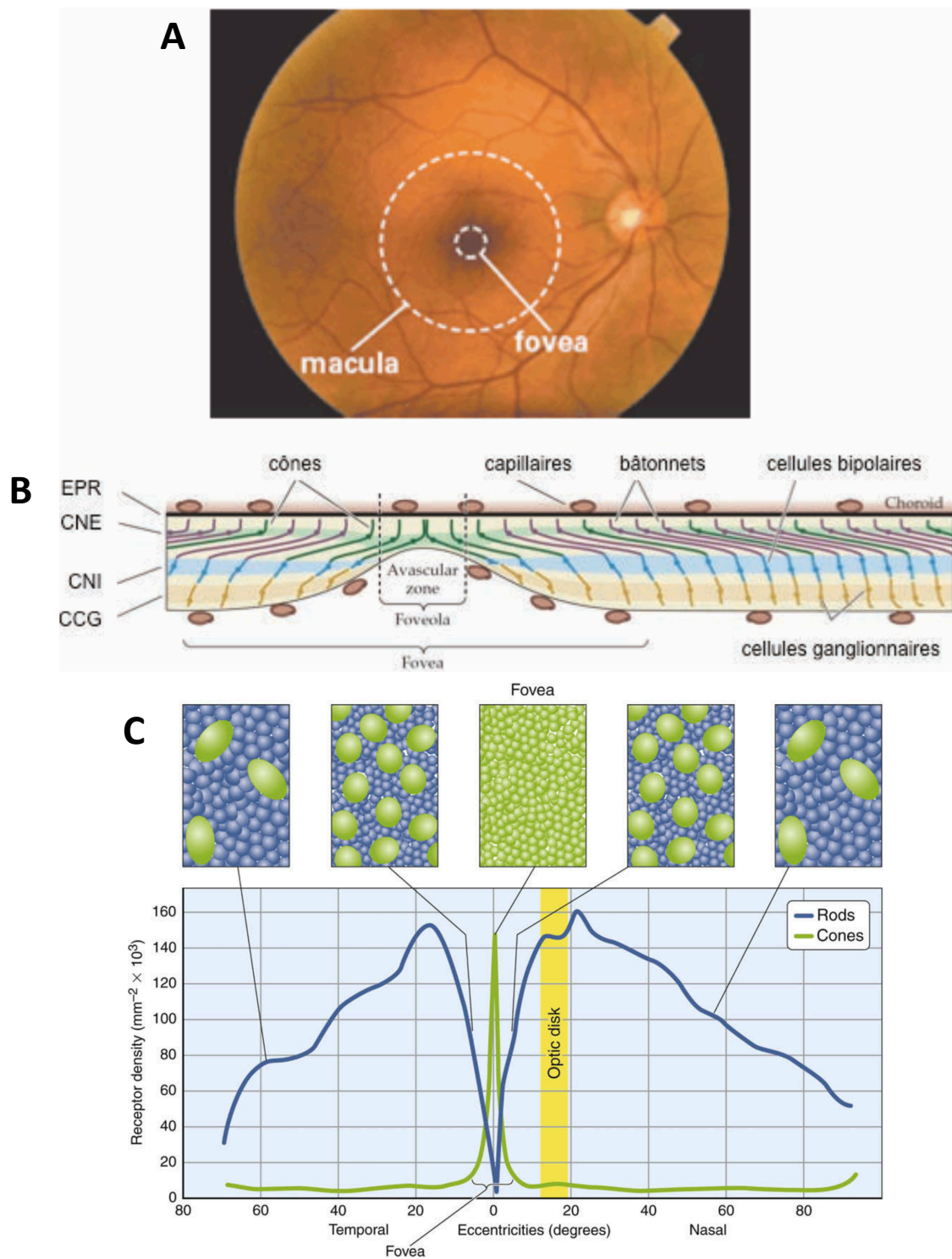


Figure 3 : Distribution des photorécepteurs dans la rétine humaine. (A) Fond d'œil humain montrant la position de la macula et de la fovéa en son centre. (B) Schéma présentant l'amincissement caractéristique de la fovéa, associé à l'absence de vaisseaux sanguins et des couches internes de la rétine, repoussées sur les côtés. (C) Schéma représentant la distribution spatiale des bâtonnets (En bleu) et des cônes (En vert) dans la rétine en fonction de l'excentricité.

(D'après Mustafi et al, 2009, Progress in Retinal and Eye Research)

La couche la plus externe de la rétine est celle des photorécepteurs, avec en premier lieu leurs segments photosensibles, puis vient la couche nucléaire externe, contenant les noyaux des photorécepteurs. Ensuite se déploie la couche plexiforme externe, au sein de laquelle s'établissent les connexions synaptiques entre photorécepteurs et cellules bipolaires, et les cellules horizontales. Dans la couche nucléaire interne qui suit, on trouve les noyaux des neurones secondaires – comme les cellules bipolaires, horizontales et amacrines - ainsi que des cellules gliales de Müller, qui ont la particularité de traverser la rétine de part et d'autre. Au sein de la couche plexiforme interne, les cellules bipolaires établissant leurs connexions synaptiques avec les cellules ganglionnaires, dont les noyaux se trouvent dans la couche nucléaire suivante. Enfin, les axones des cellules ganglionnaires se rassemblent au niveau de la couche des fibres de Henlé pour aller former le nerf optique, qui rejoint ensuite le cerveau (Figure 2).

Par la suite, nous nous focaliserons sur les photorécepteurs et les cellules macrogliales – cellules gliales de Müller : les fonctions des autres cellules de soutien – microglies, astrocytes, vaisseaux sanguins – seront moins développées.

1.2.1.3) Organisation centre-périphérie : macula et fovéa

Chez certains mammifères – comme l'homme ou le primate - se trouve une zone pigmentée au centre de la rétine, facilement identifiable lors de l'examen du fond d'œil : il s'agit de la macula, la zone de vision précise de la rétine (Figure 3 A). Certains rongeurs, comme le rat ou la souris, ne possèdent pas de macula. La macula présente une concentration très importante en cônes, qui sont les photorécepteurs responsables de la vision précise. Anatomiquement parlant, on peut identifier au sein de la macula une fovéa centrale composée exclusivement de cônes (Figure 3 C), encerclée de façon concentrique par la parafovéa et la périfovéa. Au centre de la fovéa se trouve une région encore plus particulière, la dépression fovéolaire ou fovéole. Elle est caractérisée par un amincissement de la rétine, associé à l'absence de vaisseaux sanguins et au décalage des cellules des couches internes repoussées vers la périphérie (Figure 3 B). Cet amincissement favorise l'arrivée de la lumière jusqu'aux photorécepteurs, permettant la formation d'une image extrêmement précise.

1.2.2) Histologie de la rétine

1.2.2.1) La rétine pigmentaire

Les segments externes des photorécepteurs rétiniens sont en contact direct avec l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) sous-jacent, parfois appelé rétine pigmentaire. L'EPR est lui-même séparé de la tunique vasculaire choroïdienne par la membrane de Bruch.

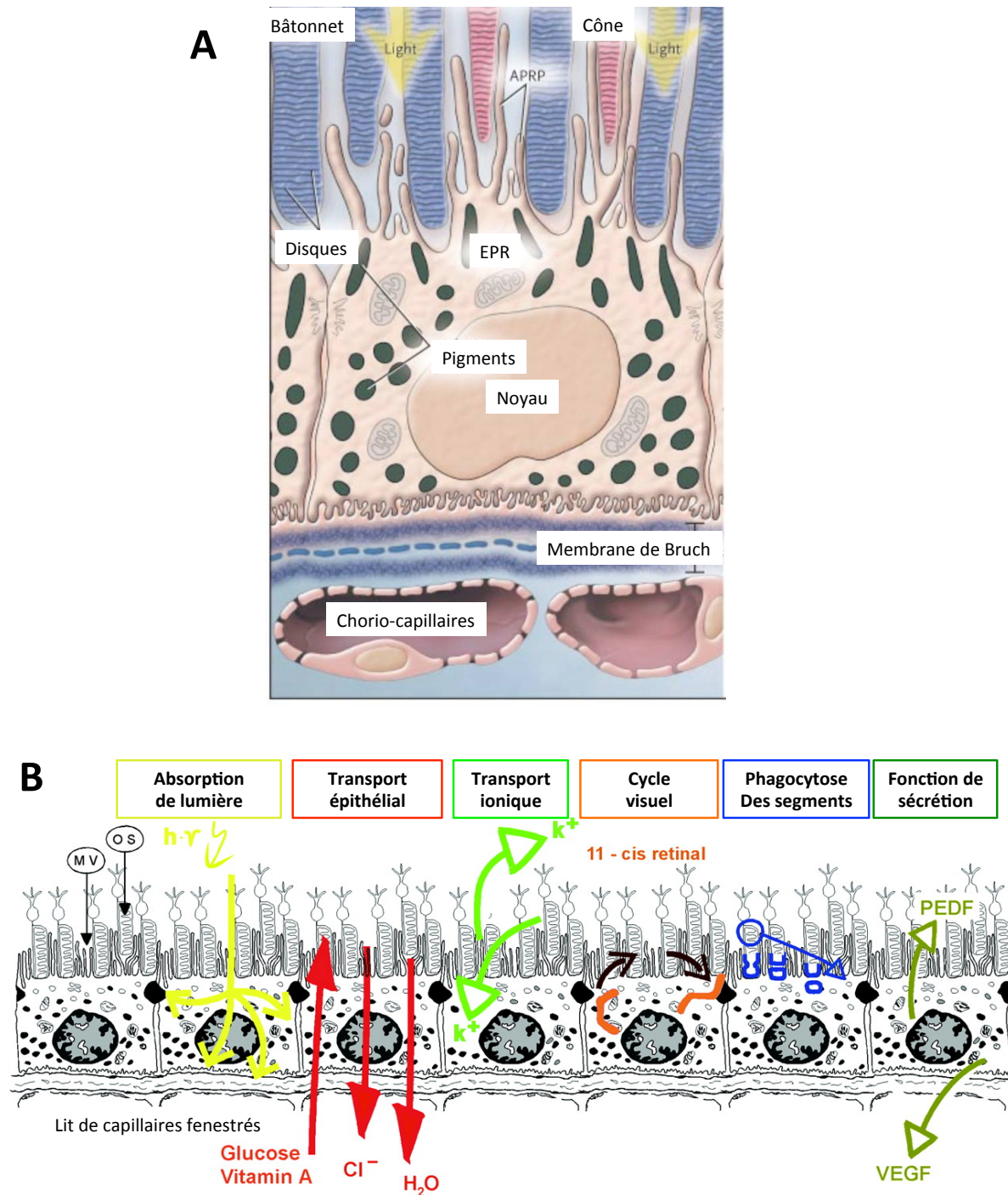


Figure 4 : L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). (A) Schéma représentant la localisation histologique de l'EPR, entre la membrane de Bruch et les segments externes des photorécepteurs, parmi lesquels les cellules de l'EPR étendent leurs microvillosités. (B) Schéma présentant les différentes fonctions de l'EPR.

(D'après Strauss, 2005, Physiol Rev)

L'EPR est une monocouche de cellules pigmentées située en dessous des segments externes des photorécepteurs. La membrane apicale des cellules de l'EPR est composée de nombreuses microvillosités qui étendent leurs prolongements le long des segments

externes (figure 4 A). La membrane basale de l'EPR fait face à la membrane de Bruch. L'EPR joue un rôle vital dans le bon fonctionnement des photorécepteurs en assurant plusieurs fonctions de support (Figure 4 B). Les pigments produits par l'EPR permettent l'absorption de l'excès d'énergie lumineuse concentrée sur la rétine (Boulton and Dayhaw-Barker, 2001). De par son rôle de barrière, l'EPR participe aussi au maintien de l'homéostasie aqueuse et ionique, en contrôlant les échanges entre l'espace sous-rétinien et les capillaires choroïdiens (Dornonville de la Cour, 1993; Hamann, 2002). Ce rôle est particulièrement important, puisque la composition ionique de l'espace sous-rétinien détermine la capacité des photorécepteurs à rester excitables (Steinberg et al., 1983). De la même manière, le transport épithélial géré par l'EPR permet de juguler l'apport en glucose et en vitamines - comme le rétinol - nécessaires au fonctionnement des photorécepteurs. L'EPR participe aussi au maintien de l'excitabilité des photorécepteurs en phagocytant les disques des segments externes qui sont ensuite digérés et assimilés (Finnemann, 2003; Gal et al., 2000), et renouvelés en permanence par les photorécepteurs eux-mêmes. L'EPR recycle aussi certains éléments produits par les photorécepteurs, comme le rétinol. Les photorécepteurs sont en effet incapables de ré-isomériser le tout-*trans*-rétinal, produit de la photo-transduction : c'est pourquoi l'EPR prend aussi en charge le cycle visuel du rétinol. De plus, l'épithélium pigmentaire produit des facteurs de croissance favorisant le maintien de l'intégrité de la paroi des choriocapillaires, et des photorécepteurs. Enfin, l'EPR joue un rôle central dans le maintien du privilège immun en sécrétant des facteurs immunosuppresseurs (Ishida et al., 2003; Streilein et al., 2002). Cet aspect sera traité plus en détail au paragraphe « 1.2.3.2) Immunosuppression ».

La membrane de Bruch, située sous la surface basale de l'EPR, est une fine structure acellulaire pentalaminaire délimitant l'EPR de la choroïde. Elle est composée d'une couche d'élastine, entourée par deux couches de collagène, et cette structure est elle-même délimitée par une membrane basale interne et une membrane basale externe situées de part et d'autre.

La choroïde enfin, est majoritairement constituée de vaisseaux sanguins, de mélanocytes, des macrophages et de fibroblastes. Sa fonction majeure est de fournir la rétine externe - dépourvue de vaisseaux - en oxygène et en nutriments, mais elle participe aussi à la thermorégulation ainsi qu'à l'absorption de lumière. C'est à partir des choriocapillaires - un réseau hautement anastomosé de capillaires fenestrés - situés à proximité de la membrane de Bruch que s'effectue la diffusion de nutriments destinés aux photorécepteurs, très actifs métaboliquement.

1.2.2.2) La rétine neurosensorielle

1.2.2.2.1) Les neurones

1.2.2.2.1.1) Les photorécepteurs

Les photorécepteurs sont les neurones photosensibles situés dans la partie la plus externe de la rétine : ils initient la chaîne visuelle, en convertissant les signaux lumineux en signaux électriques grâce à la photo-transduction. Il existe deux types de photorécepteurs : les cônes, et les bâtonnets (Figure 5). Au niveau de la rétine des mammifères, on dénombre environ dix fois moins de cônes que de bâtonnets. Chez les animaux possédant une macula, leur répartition n'est pas homogène et les cônes sont majoritairement localisés au centre de la rétine, au niveau de la macula, zone d'où les bâtonnets sont pratiquement absents. Au sein de la rétine, les noyaux des cônes sont majoritairement disposés le long d'une couche suivant la membrane limitante externe, alors que les noyaux des bâtonnets sont répartis en une dizaine de couches.

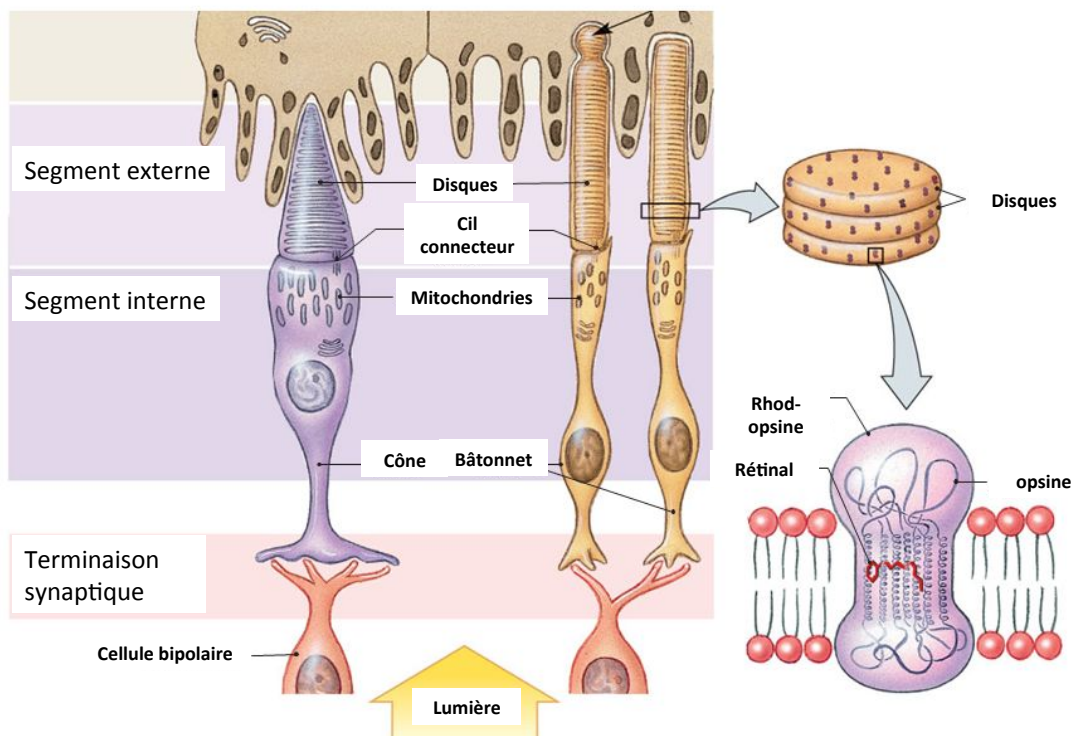


Figure 5 : Structure des photorécepteurs, cônes et bâtonnets.

Les cônes et les bâtonnets ne diffèrent pas seulement par leur distribution, mais aussi par leur forme, et les photo-pigments qu'ils expriment, respectivement opsines et rhodopsines : ces disparités révèlent leurs différentes fonctions. Les cônes interviennent

dans la vision centrale diurne (en conditions photopiques) : ils sont moins sensibles à la lumière que les bâtonnets, mais sont associés à des circuits neuronaux favorisant une haute résolution spatiale. Ces réseaux permettent de percevoir les couleurs, et de discerner les visages ou les lettres. Les bâtonnets interviennent dans la vision périphérique nocturne (en conditions scotopiques) : leur seuil d'excitation est moins élevé que celui des cônes – il suffit d'un seul photon, alors que plus de 100 photons sont nécessaires pour induire une réponse similaire chez les cônes – mais les réseaux neuronaux auxquels ils sont associés ne permettent pas d'atteindre une résolution visuelle aussi élevée.

Les photorécepteurs sont composés (i) d'un segment externe, un empilement de disques – formés à partir de replis membranaires – contenant les pigments visuels, (ii) un segment interne, contenant la machinerie permettant la synthèse d'énergie et d'opsines, et relié au segment externe par un cil connecteur, (iii) un corps cellulaire, et (iv) une dendrite terminée par une synapse, permettant la communication nerveuse avec les neurones secondaires.

C'est l'architecture des segments externes qui confère leurs différences fonctionnelles aux cônes et aux bâtonnets. Chez les bâtonnets, le segment externe est plus long, et est composé d'un empilement de disques, dissociés de la membrane plasmique du cil connecteur. Chez les cônes, plus courts, la série de disques est formée par des évaginations de la membrane plasmique : ils sont donc tous connectés à la membrane qui se prolonge à partir du cil connecteur. Les segments externes étant sollicités en permanence, ils sont continuellement renouvelés grâce à un équilibre entre la phagocytose réalisée par les cellules de l'épithélium pigmentaire sous-jacent, et la croissance au niveau du cil connecteur.

A l'obscurité, la membrane des cônes et des bâtonnets est dépolarisée, et ils libèrent en permanence le neurotransmetteur glutamate au niveau de leur synapse : l'exposition à la lumière entraîne une hyperpolarisation membranaire, et la transmission synaptique est alors interrompue. Le mécanisme qui sous-tend ces régulations est aujourd'hui connu : c'est la phototransduction. Dans les photorécepteurs, le processus de phototransduction peut être décomposé en plusieurs étapes. La première est la photoactivation : lorsque le rétinol-11-*cis* absorbe un photon, il est photo-isomérisé en *trans*-rétinal, ce qui induit une modification de la conformation de l'opsine. Cette modification permet à l'opsine de se lier à la transducine, une protéine G : la liaison entre ces deux protéines entraîne le remplacement d'un GDP par un GTP, et active la sous-unité alpha de la transducine, qui se détache pour activer une phosphodiesterase associée à la membrane. Cette enzyme va à son tour hydrolyser le GMPc, entraînant la fermeture des canaux ioniques : la cellule ainsi hyperpolarisée interrompt alors la libération synaptique de glutamate.

1.2.2.2.1.2) Les autres neurones rétiniens

La cellule bipolaire est le premier type de neurone de projection rétinien : elle établit un relai synaptique entre les photorécepteurs et les cellules ganglionnaires (Figure 6). Les cellules bipolaires jouent un rôle central dans l'intégration du signal nerveux : elles sont en contact avec toutes les autres catégories de neurones rétiniens, et apportent les premières modifications à l'intégration de l'input nerveux. Il existe plus de dix types de cellules bipolaires dans la rétine des mammifères, mais elles sont plus souvent organisées selon le type ON ou OFF de leur réponse électrochimique aux signaux transmis (Hartveit, 1997).

En plus des cellules bipolaires, il existe deux autres familles d'interneurones au niveau de la rétine interne, les cellules horizontales et les cellules amacrines (Figure 6). Les cellules horizontales permettent d'augmenter le contraste visuel. Quand un photorécepteur est éclairé et stimulé, la cellule horizontale a un effet inhibiteur sur les photorécepteurs environnants : ce phénomène d'inhibition latérale permet d'éviter une confusion du signal et intervient dans la détection des mouvements.

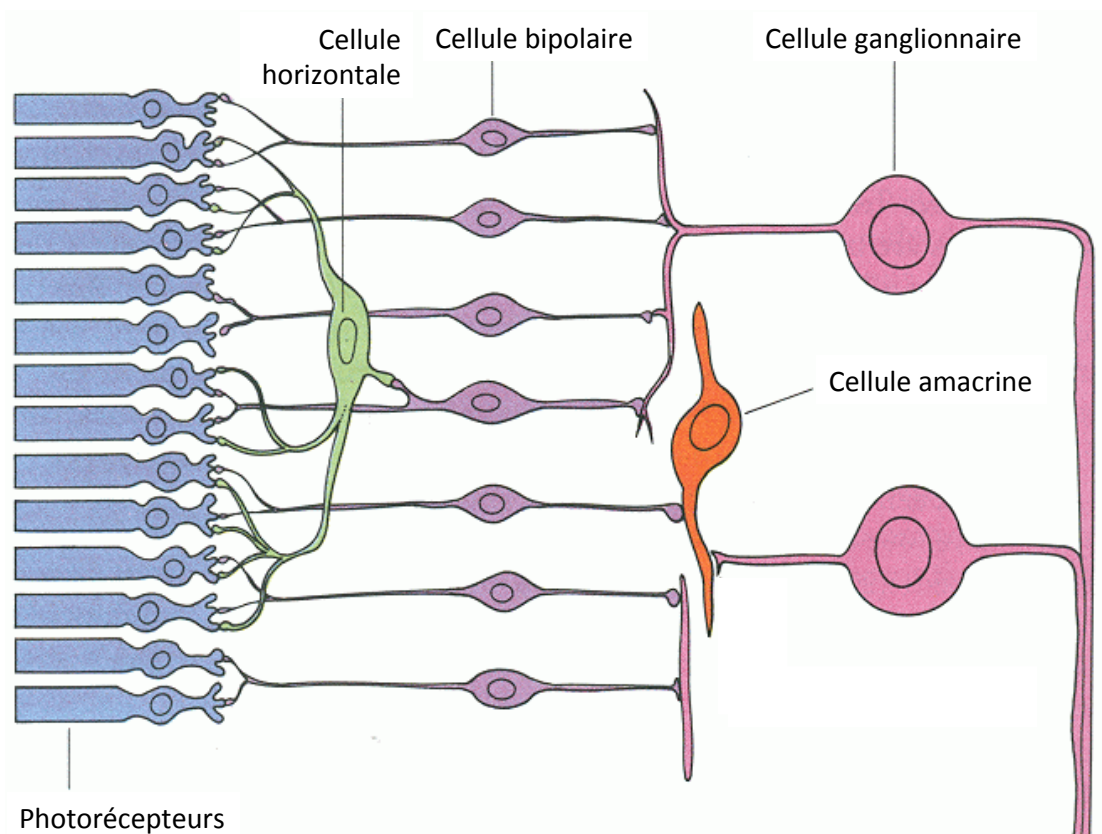


Figure 6 : Le réseau neuronal rétinien. L'influx nerveux se propage des photorécepteurs aux cellules bipolaires, puis aux cellules ganglionnaires, et est modulé par les cellules horizontales et amacrines.

(D'après David Hubel, Harvard University)

Les cellules amacrines établissent des connexions multiples avec les cellules bipolaires et ganglionnaires, notamment de par leur localisation privilégiée au sein de la couche plexiforme interne. Aujourd'hui, entre 20 et 30 types de cellules amacrines (Balasubramanian and Gan, 2014; MacNeil and Masland, 1998) sont référencées. Elles sont différenciées par leur morphologie, et il a été établi que la majorité d'entre elles (85%) établissent des synapses inhibitrices, en produisant des neurotransmetteurs de type GABA ou glycine (Menger et al., 1998). Les cellules amacrines établissent en fait un réseau qui module l'intégration des signaux nerveux provenant des cellules bipolaires, à destination des cellules ganglionnaires : il s'agit des dernières modifications apportées à l'input avant son envoi jusqu'au cerveau.

Après avoir subis des modifications *via* l'activité des interneurons, le signal nerveux atteint la couche des cellules ganglionnaires rétinienne, dont il existe plus de 30 types. Leurs noyaux sont tous localisés dans cette couche, et les cellules ganglionnaires disposent d'une arborescence de dendrites réparties dans la plexiforme interne leur permettant de collecter le signal nerveux, ainsi que d'un axone qui se prolonge jusqu'au cerveau, *via* les nerfs optiques.

1.2.2.2.2) Les cellules gliales de la rétine

1.2.2.2.3.1) Les cellules macrogliales

La cellule gliale de Müller compte pour 90% de la glie rétinienne, et en est donc un composant majeur : elle appartient à la catégorie des cellules gliales radiaires, au même titre que la cellule de Bergmann que l'on retrouve dans le cervelet. Les cellules de Müller ont donc la particularité d'être orientées de manière radiale, et traversent la rétine de part en part (Figure 7). Elles étendent leurs prolongements depuis la couche des cellules ganglionnaires – à la frontière de la cavité vitréenne – jusqu'à la couche nucléaire externe – là où commence l'espace sous-rétinien. Les cellules de Müller jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement physiologique de la rétine, et sont très souvent impliquées dans les pathologies rétinienne neuro-dégénératives, comme la rétinopathie diabétique (Gerhardinger et al., 2005), le décollement de rétine (Francke et al., 2001) ou la télangiectasie maculaire de type II (Powner et al., 2013). De par leur position privilégiée, c'est-à-dire en enroulant leurs prolongements cytoplasmiques autour des capillaires sanguins et des neurones, les cellules de Müller contribuent au maintien de l'homéostasie rétinienne à différents niveaux (Figure 7). Tout d'abord, elles régulent les flux aqueux et ioniques (Nagelhus et al., 1998, 1999) : le transporteur potassique Kir4.1 et le canal aqueux AQP4 jouent un rôle majeur dans la régulation des échanges osmotiques (Kofuji et al., 2000). Les cellules de Müller participent au transport des nutriments, et à l'évacuation des déchets métaboliques (Tsacopoulos and Magistretti, 1996), et au maintien de la barrière hémato-rétinienne (Tout et al., 1993).

De plus, les cellules gliales de Müller favorisent la survie des neurones via la production de facteurs neurotrophiques : ainsi, l'ablation conditionnelle des cellules de Müller induit l'apoptose des photorécepteurs, mais cet effet peut être inhibé par l'ajout de facteurs neurotrophiques exogènes (Shen et al., 2012). Enfin, elles jouent un rôle indispensable dans la transmission synaptique en participant au recyclage des neurotransmetteurs (Reichenbach and Bringmann, 2013). Les cellules de Müller ont à leur disposition tout un arsenal de transporteurs permettant la capture et la libération de glutamate. L'implication de ces transporteurs en conditions pathologiques sera traitée dans le chapitre « 3.2.1.2.) Toxicité du glutamate ».

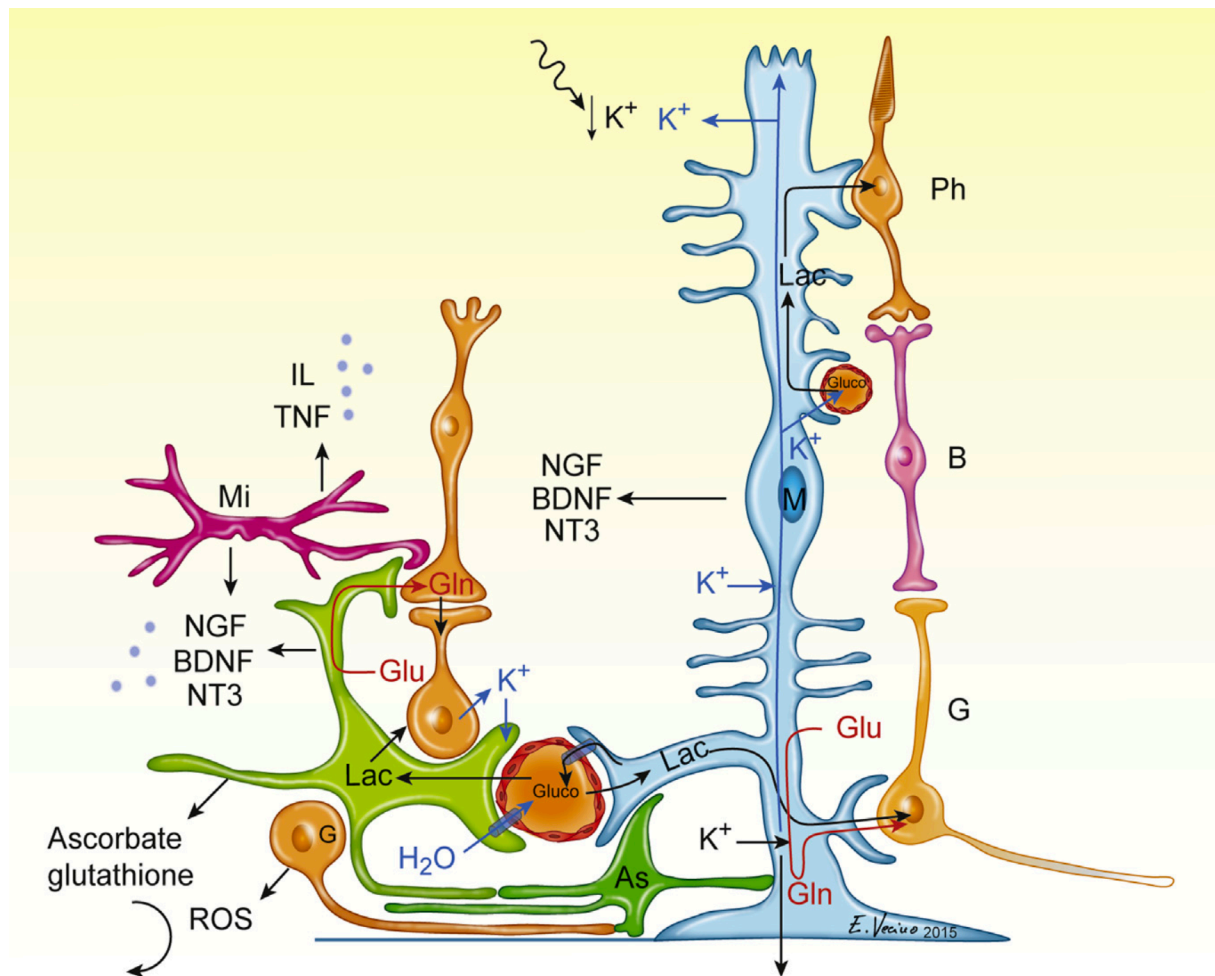


Figure 7 : La cellule gliale de Müller. Schéma d'une cellule gliale de Müller (En bleu), mettant en évidence les nombreuses interactions établies avec les autres cellules rétinienne, et qui favorisent son rôle central de régulateur homéostatique. Mi : microglie. As : astrocyte. G : cellule ganglionnaire. Ph : photorécepteur. B : cellule bipolaire. M : cellule gliale de Müller. Glu : glutamate. Gln : glutamine.

(D'après Vecino et al, 2016, Progress in Retinal and Eye Reseach)

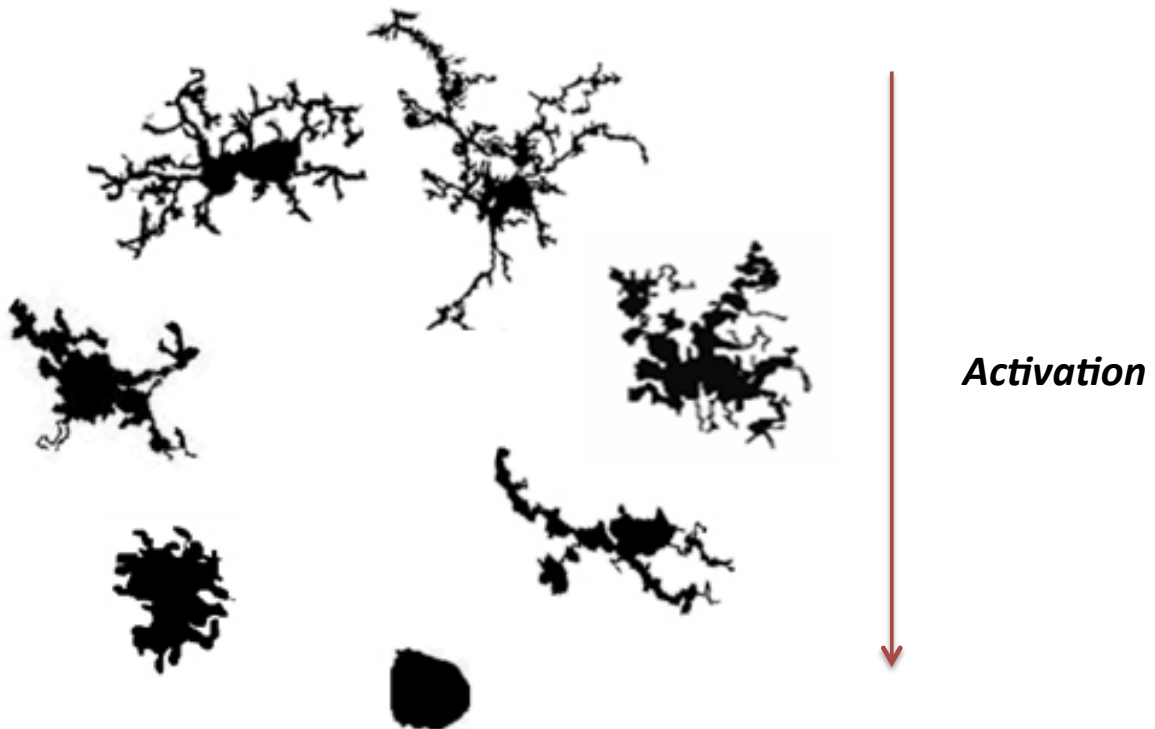
Les astrocytes – qui tirent leur nom de leur forme stellaire – sont majoritairement localisés dans la couche la plus interne de la rétine. Leur distribution est corrélée avec la présence et la distribution des vaisseaux sanguins rétiniens. Les cellules astrocytaires étendent leurs prolongements autour des vaisseaux sanguins et des axones des

neurones de la couche ganglionnaire : leur distribution dépend donc aussi de la densité des fibres nerveuses (Rungger-Brandle et al., 1993). Comme dans le cerveau, les astrocytes rétiniens participent au maintien de la barrière hémato-rétinienne, et au support neurotrophique des neurones.

1.2.2.2.3.2) Les microglies résidentes

La microglie est le macrophage résident du système nerveux central, et appartient au système des phagocytes mononucléés. Il s'agit d'une cellule immunitaire modulant la réponse inflammatoire en cas d'infection, mais qui joue aussi un rôle essentiel dans la surveillance (Nimmerjahn et al., 2005) via ses nombreux prolongements cytoplasmiques (Davalos et al., 2005), et dans le maintien de l'homéostasie rétinienne.

Microglie ramifiée, au « repos » (Etat senseur)



Microglie non-ramifiée ou amiboïde, activée

Figure 8 : Microglie ramifiée et non-ramifiée. Schéma présentant les différentes morphologies de microglies en fonction de leur niveau d'activation.

(D'après Colton et al, 2000, Ann NY Acad Sci)

Les microglies colonisent le système nerveux central dès le développement au cours de l'embryogénèse, à partir de progéniteurs myéloïdes présents dans le sac vitellin (Ginhoux et al., 2010a), et se répandent au sein du tissu en suivant les réseaux neuronaux, vasculaires ou gliaux (Rezaie and Male, 1999). En conditions physiologiques,

les microglies présentent une morphologie caractéristique d'un état dit « quiescent » (Figure 8), mais qui correspond en fait à un rôle de senseur actif. Les microglies adoptent alors une forme extrêmement ramifiée et qui présente des prolongements très mobiles, considérablement différente de leur état dit « activé », où elles présentent une morphologie amiboïde (Davis et al., 1994) (Figure 8). Dans les conditions basales, les microglies sont majoritairement localisées dans les couches les plus internes de la rétine, mais elles peuvent se déplacer dans la couche des photorécepteurs ou l'espace sous-rétinien dans le cadre d'une réponse inflammatoire.

Les microglies interagissent en permanence avec leur environnement, et particulièrement avec les populations neuronales. Le meilleur exemple de ce type d'interaction neurone-glie, est le système CX3CL1/CX3CR1. La fractalkine, ou CX3CL1 est une chimiokine produite par les neurones et présente sous deux formes, soluble ou liée à la membrane (Bazan et al., 1997). Elle se lie au récepteur CX3CR1, qui est un récepteur à sept domaines membranaires couplé à une protéine G et exprimé par les microglies (Jung et al., 2000). L'interaction entre le ligand et son récepteur induit un signal inhibiteur tonique, qui maintient la microglie dans un état non-activé en condition basale, permettant ainsi de prévenir le développement d'une réponse inflammatoire excessive en absence d'atteinte neuronale (Harrison et al., 1998). En absence de CX3CR1, les microglies répondent plus fortement aux stimuli excitateurs, et induisent une toxicité dirigée contre les neurones (Cardona et al., 2006). Cette caractéristique a permis de développer un modèle murin de dégénérescence maculaire liée à l'âge à partir de souris déficientes en *Cx3cr1*, associé à l'accumulation de macrophages sous-rétiniens (Combadière et al., 2007).

1.2.2.3) Le réseau vasculaire rétinien

La rétine est l'un des tissus du corps humain les plus actifs métaboliquement. Chez les mammifères, la microcirculation rétinienne repose sur un réseau vasculaire organisé en trois couches de vaisseaux présents dans la rétine interne, avec un plexus vasculaire supérieur, intermédiaire, et profond. Ce réseau très dense permet de couvrir l'apport métabolique en oxygène et en nutriments nécessaire au fonctionnement de la rétine interne. Comme nous l'avons vu précédemment, la couche des photorécepteurs étant dépourvue de vaisseaux sanguins, la diffusion de métabolites est majoritairement organisée à partir des choriocapillaires.

La vasculature rétinienne suit une architecture classique : les branchements des artères donnent des artérioles qui alimentent un réseau de capillaires. Ce réseau est ensuite drainé par un ensemble de vénules qui se regroupent pour former les veines.

Ce réseau vasculaire forme la barrière hémato-rétinienne interne, et limite le passage aberrant des molécules circulant dans le sang du compartiment sanguin au compartiment tissulaire. Ce contrôle est permis par l'organisation sophistiquée de cette barrière, dont la composition sera détaillée au chapitre suivant « 1.2.3.1) Barrière hémato-rétinienne ».

1.2.3) Le privilège immun

L'œil est l'un des organes du corps humain auquel l'évolution a attribué une caractéristique assez singulière : le privilège immun. Ce mécanisme d'adaptation vise à protéger certaines structures vitales contre les dommages que pourrait entraîner une forte réaction inflammatoire : on conçoit aisément que la présence d'une cicatrice sur la rétine aurait un effet dommageable sur la perception visuelle. De plus, les neurones n'ont pas la capacité de se régénérer : c'est pourquoi le cerveau bénéficie lui aussi d'un tel privilège. Nous verrons ici comment s'organise le privilège immun autour de la rétine, en (i) empêchant l'intrusion de cellules immunitaires et (ii) favorisant leur élimination via des mécanismes immunosuppresseurs.

1.2.3.1) Barrière hémato-rétinienne

L'existence d'une barrière hémato-encéphalique (BHE) – notion introduite par Ehrlich et Goldman en 1909 - a fait débat pendant plusieurs dizaines d'années, jusqu'à ce que des recherches intensives conduisent à une résolution de ce débat et à une définition claire de ce qu'est la BHE (Bradbury, 1979). Le fonctionnement physiologique d'une barrière entre le sang et un tissu doit être perçu à travers l'interaction de plusieurs aspects restrictifs, permettant malgré tout la diffusion d'oxygène et de nutriments, comme le glucose (Ban and Rizzolo, 2000). Dans la rétine, il existe deux types de barrières hémato-rétiniennes (BHR) : une BHR interne formée par la paroi de vaisseaux présents dans la rétine interne, et une BHR externe constituée par les cellules épithéliales de l'épithélium pigmentaire. La BHR interne se trouve au niveau des plexus vasculaires de la rétine interne, et est formée par l'ensemble endothélium vasculaire/cellules gliales : au niveau du plexus supérieur, ce sont les astrocytes qui participent à la barrière, et au niveau du plexus profond, les cellules gliales de Müller (Rizzolo et al., 2011). La lame basale de l'endothélium et les péricytes participent eux aussi à la formation de cette barrière. Quant à la BHR externe, son organisation est sensiblement différente, puisqu'elle est constituée par la monocouche de cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), dérivée du neuro-épithélium embryonnaire (Rizzolo, 2007). L'efficacité de cette barrière est renforcée par la présence de jonctions serrées, riches en claudines et en occludines, permettant de joindre les cellules épithéliales de l'EPR (Konari et al., 1995; Nishiyama et al., 2002) : ainsi, les cellules circulantes ayant quitté les capillaires choroïdiens fenestrés n'ont théoriquement pas la possibilité de s'infiltrer jusque dans la rétine (Morcos et al., 2001). Cependant, l'intégrité des jonctions entre les cellules de l'EPR n'est pas à toute épreuve : l'épithélium pigmentaire est sensible au stress oxydant (Bailey et al., 2004), à la présence de macrophages péri-vasculaires (Boven et al., 2000), ou à l'action du TNF- α (Bamforth et al., 1996). Dans certaines conditions pathologiques, la BHR est ainsi déstabilisée, et ne permet plus d'empêcher correctement l'extravasation de monocytes circulants ou d'autres cellules inflammatoires (El Mathari et al., 2015; Narimatsu et al., 2013; Xu et al., 2005).

1.2.3.2) Immunosuppression

A la jonction entre la rétine neurale et la rétine pigmentaire, l'ensemble formé par la couche des photorécepteurs et l'épithélium pigmentaire en surplomb crée une zone dépourvue de vaisseaux sanguins : de plus, en condition physiologique, l'espace sous-rétinien, qui est la zone se trouvant entre les segments externes des photorécepteurs et l'EPR, est dépourvu de leucocytes (Figure 9 A). La membrane de Bruch, qui sépare l'EPR des chorio-capillaires qui sont en dessous, est composée de protéines matricielles qui ont un effet suppresseur sur la croissance des vaisseaux choroïdiens, et qui interviennent aussi dans l'effet immunosuppresseur de l'EPR.

Jusqu'au début des années 2000, on pensait que le privilège immun était maintenu uniquement par la séquestration d'antigènes (Streilein et al., 1992), l'absence de drainage lymphatique (Medawar, 1948), et la barrière hémato-rétinienne (Morcos et al., 2001). Mais il a été montré que l'EPR a un effet immunosuppresseur (Wenkel and Streilein, 2000) : c'est à dire qu'il exprime des facteurs solubles qui ont pour effet d'étouffer les réactions inflammatoires d'origine immunitaire, en protégeant ainsi les photorécepteurs d'une réaction inflammatoire exacerbée et maintenue sur le long terme, qui causerait des dommages au tissu.

Le système Fas-FasL induit par l'EPR est son outil le plus puissant pour favoriser le privilège immun, en induisant l'apoptose des cellules immunitaires (Griffith et al., 1995). Il est intéressant de noter que la surexpression de FasL (Fas ligand) dans une allogreffe ne suffit pas à reproduire les conditions du privilège immun (Kang et al., 1997), mais que l'inactivation génétique de FasL favorise l'accumulation sous-rétinienne de phagocytes mononucléés dans un modèle d'inflammation sous-rétinienne (Levy et al., 2015a). Cela suggère que la synergie de plusieurs facteurs est nécessaire pour éliminer correctement les macrophages qui entrent en contact avec l'EPR (Figure 9B).

L'EPR a en effet à sa disposition un autre système participant à l'élimination des phagocytes mononucléés : le système TSP-1/CD47. La Thrombospondine 1 (TSP-1) intervient dans de nombreux mécanismes biologiques, y compris l'immuno-modulation (Housset and Sennlaub, 2015) : elle est synthétisée par l'EPR (Miyajima-Uchida et al., 2000), et peut interagir avec le récepteur CD47 via sa séquence C-terminale (Lawler and Hynes, 1986). Or, l'activation du récepteur CD47 sensibilise les cellules à la mort induite par FasL (Manna et al., 2005). Dans un article récemment publié (Calippe et al., 2017), notre groupe a montré que la déficience en TSP-1 est effectivement associée à l'accumulation sous-rétinienne de phagocytes mononucléés, de même que la déficience en CD47, et l'utilisation de TSP-1 recombinante a permis d'accélérer l'élimination de ces macrophages. L'activation du récepteur CD47 rend donc les macrophages plus sensibles à l'apoptose induite par FasL (Figure 9B). Notons qu'il existe d'autres facteurs solubles immunosuppresseurs produits par l'EPR, comme le facteur de croissance TGF- β (Tanihara et al., 1993).

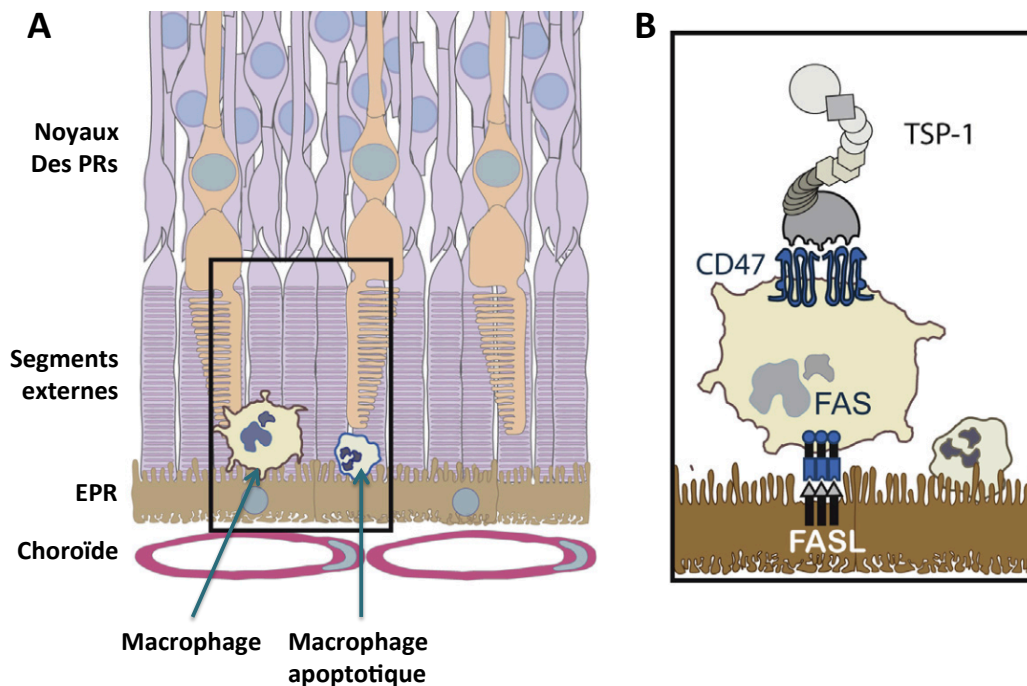


Figure 9 : Environnement immunosuppresseur de la rétine externe. Au niveau de l'espace sous-rétinien, l'activation du récepteur CD47 des macrophages par TSP-1 sensibilise les cellules inflammatoires à l'élimination induite par FasL. PRs : photorécepteurs. EPR : épithélium pigmentaire rétinien.

(Guillonnet al, 2017, Progress in Retinal & Eye Research)

1.3) Pathologies les plus fréquentes de la rétine

1.3.1) La rétinopathie diabétique

La rétinopathie diabétique (RD) est une complication courante du diabète, et est responsable d'une perte de vision sévère chez 30% des patients diabétiques (Wong et al., 2006). Sans traitement, la maladie progresse d'un stade modéré non-prolifératif à un état prolifératif sévère et avancé, caractérisé par la croissance de néo-vaisseaux rétiniens : quel que soit le stade concerné, la pathologie peut aussi être associée à la présence d'œdème rétinien. Au milieu des années 2000, l'introduction de l'administration intra-vitréenne d'anti-VEGF a permis une avancée spectaculaire dans le traitement de l'œdème maculaire associé à la RD. Les anti-VEGFs permettent la restauration de la vision chez une majorité de patients diabétiques (Varma et al., 2015). En France, la photocoagulation laser est aussi utilisée, afin de ralentir ou stopper la perte de vision (Bressler et al., 2011).

En terme de patho-mécanisme, l'accumulation de glutamate extracellulaire, ainsi qu'un défaut dans la production de facteurs neuroprotecteurs, semblent jouer un rôle primordial dans la neurodégénérescence rétinienne associée au diabète (Simó and Hernández, 2014). Le glutamate est un neurotransmetteur excitateur qui produit un

effet toxique sur les neurones lorsqu'il est en excès (Pulido et al., 2007). Le manque de facteurs neuroprotecteurs pourrait compromettre la protection neuronale contre ces mécanismes neurotoxiques. Ces caractéristiques font intervenir des dérégulations produites à l'échelle des cellules gliales (Mizutani et al., 1998; Omri et al., 2011), et pourraient contribuer à l'expression de médiateurs inflammatoires, favorisant l'aggravation de la pathologie.

1.3.2) La rétinite pigmentaire

Le terme « rétinite pigmentaire (RP) », ou *retinitis pigmentosa*, fait référence à un groupe de dystrophies rétiniennes héréditaires dégénératives, caractérisées par une perte progressive de la vision chez les patients, conduisant à la cécité. La RP a une prévalence de 1/3000 à 1/5000 (Bertelsen et al., 2014), avec un diagnostic difficile à établir précocement quand le patient n'a pas d'antécédents familiaux (Hamel, 2006).

Dans la plupart des cas, les patients RP présentent en premier lieu une perte des photorécepteurs en bâtonnets, qui entraîne une déficience de la vision nocturne – héméralopie - puis de la vision périphérique en journée. Cette dégénérescence est associée dans un deuxième temps à la mort des photorécepteurs en cônes, qui entraîne sur le long terme une perte totale de la vision.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement standard établi pour les patients RP, mais plusieurs voies thérapeutiques sont explorées, comme la thérapie cellulaire ou la thérapie génique. En cas de dégénérescence trop avancée, le système de prothèse rétinienne, ou Argus II, permet de contourner les photorécepteurs endommagés via l'implantation d'une rétine artificielle (Berger et al., 2016). Les médecins préconisent essentiellement des méthodes visant au retardement de l'évolution de la maladie : on conseille aux patients de réduire leur exposition à la lumière, et de suivre un régime supplémenté en vitamine A (Berson, 1993), bien que le bénéfice de ces approches soit encore débattu (Rayapudi et al., 2013).

1.3.3) DMLA

La dégénérescence maculaire liée à l'âge, ou DMLA, est la première cause de cécité chez les seniors dans les pays développés. Elle est associée à une combinaison de plusieurs facteurs génétiques et environnementaux. La DMLA présente deux formes tardives : une forme humide, et une forme sèche pour laquelle il n'existe actuellement aucun traitement. Dans les deux cas, la DMLA entraîne une perte gravissime de la vision en endommageant la rétine centrale de manière irrémédiable.

Les caractéristiques de la DMLA seront exhaustivement traitées au chapitre suivant « II) DMLA et inflammation ».

II) DMLA & inflammation

2.1) Physiopathologie de la DMLA

La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age est une pathologie dégénérative de la rétine et qui affecte la fovéa, zone centrale de la rétine riche en cônes et responsable de l'acuité visuelle. C'est la première cause de déficience visuelle au monde : elle affecte plus de 150 millions d'individus (Wong et al., 2014).

2.1.1) La maculopathie liée à l'âge

Le premier stade de la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA) est un stade asymptomatique dit maculopathie liée à l'âge. A l'examen du fond d'œil, on peut observer des dépôts lipoprotéiques appelés drusens (Figure 10 B), localisés entre la membrane de Bruch et l'épithélium pigmentaire (EPR), et dont la distribution et la taille varient d'un patient à l'autre ; on observe aussi une pigmentation irrégulière de l'EPR (Bird et al., 1995).

Les drusens, présents au stade maculopathie, peuvent prendre la forme de dépôts linéaires ou de protrusions plus larges – supérieures à 125 um - appelées drusens « soft » (Curcio and Millican, 1999; Sarks, 1976). Ces protrusions déforment la rétine, ce qui conduit à l'apparition des métamorphopsies (Biarnés et al., 2011) (Figure 10 H), et sont associées à une diminution de l'épaisseur de la couche des photorécepteurs (Schuman et al., 2009), ainsi qu'à une perte de sensibilité (Midena et al., 2007; Puell et al., 2012). Les drusens dits « hard », de plus petite taille – inférieure à 63 um - ne sont généralement pas associés au développement de la maladie, sauf si ils sont présents en grand nombre au niveau de la macula (Klein et al., 2004).

2.1.2) Les formes tardives de la DMLA

On ne connaît pas encore toutes les raisons qui expliquent pourquoi les patients souffrant de maculopathie liée à l'âge développent les formes tardives de la DMLA, mais il semblerait que cette évolution soit liée à une combinaison entre certains facteurs de risques environnementaux, et une prédisposition génétique (Yu et al., 2012). Il existe deux formes cliniques de DMLA tardive : la DMLA exsudative ou humide, et la DMLA atrophique ou sèche (Sarks, 1976).

2.1.2.1) Forme sèche

L'atrophie géographique est l'une des formes tardives de la DMLA : elle est caractérisée par la perte irréversible des photorécepteurs, et la dégénérescence de l'épithélium

pigmentaire rétinien (EPR) (Holz et al., 2014; Sarks et al., 1988). L'atrophie géographique affecte approximativement 5 millions de personnes à travers le monde, et sa prévalence augmente exponentiellement avec l'âge (Rudnicka et al., 2015; Wong et al., 2014). La lésion atrophique se développe d'abord au niveau de la périfovée (Sarks et al., 1988), puis s'étend progressivement jusqu'à atteindre la fovée elle-même (Figure 10 E) : l'atrophie est typiquement bilatérale (Lindblad et al., 2009). L'atrophie de la zone périfovéale affecte la performance visuelle, ce qui a un impact considérable sur les capacités liées à la lecture, la conduite, et la perception visuelle en conditions scotopiques (Brown et al., 2014; Sunness et al., 1997). Lorsque la lésion atteint la fovée, l'acuité visuelle centrale est profondément affectée (Lindblad et al., 2009) (Figure 10 G, I), et la nature et la vitesse de progression de la lésion varient significativement selon les patients.

2.1.2.2) Forme humide

La deuxième forme tardive de la DMLA est appelée forme humide, ou stade néo-vasculaire, et progresse rapidement. La DMLA humide est caractérisée par la formation de néo-vaisseaux qui se développent à partir de la choroïde dans 85% des cas, et conduisent à l'accumulation intra-rétinienne ou sous-rétinienne de fluides (Figure 10 F), sang et lipides (Rosenfeld et al., 2006) jusqu'à former des exsudats vasculaires ou un œdème maculaire, voire un décollement de rétine. L'accumulation de fluides s'accompagne de la croissance d'une membrane fibreuse néo-vasculaire, qui sur le long terme entraîne la perte irréversible de la vision associée la formation d'une cicatrice disciforme sous-rétinienne (Sarks, 1976). La croissance des néo-vaisseaux dépend de la production de VEGF (Rosenfeld et al., 2006), produit par les cellules de l'EPR, ou par les macrophages qui s'accumulent dans l'espace sous-rétinien (Ishibashi et al., 1997). On recense deux types de néo-vaisseaux choroïdiens : les néo-vaisseaux occultes, qui se développent sous l'EPR, et les néo-vaisseaux classiques, qui traversent l'EPR et envahissent la couche des photorécepteurs, et sont donc visibles en fond d'œil.

2.2) Caractéristiques de la DMLA

2.2.1) Statistiques épidémiologiques

Les premiers symptômes cliniques de la DMLA peuvent apparaître dès 50 ans, et augmentent ensuite progressivement avec l'âge jusqu'à la perte totale de vision.

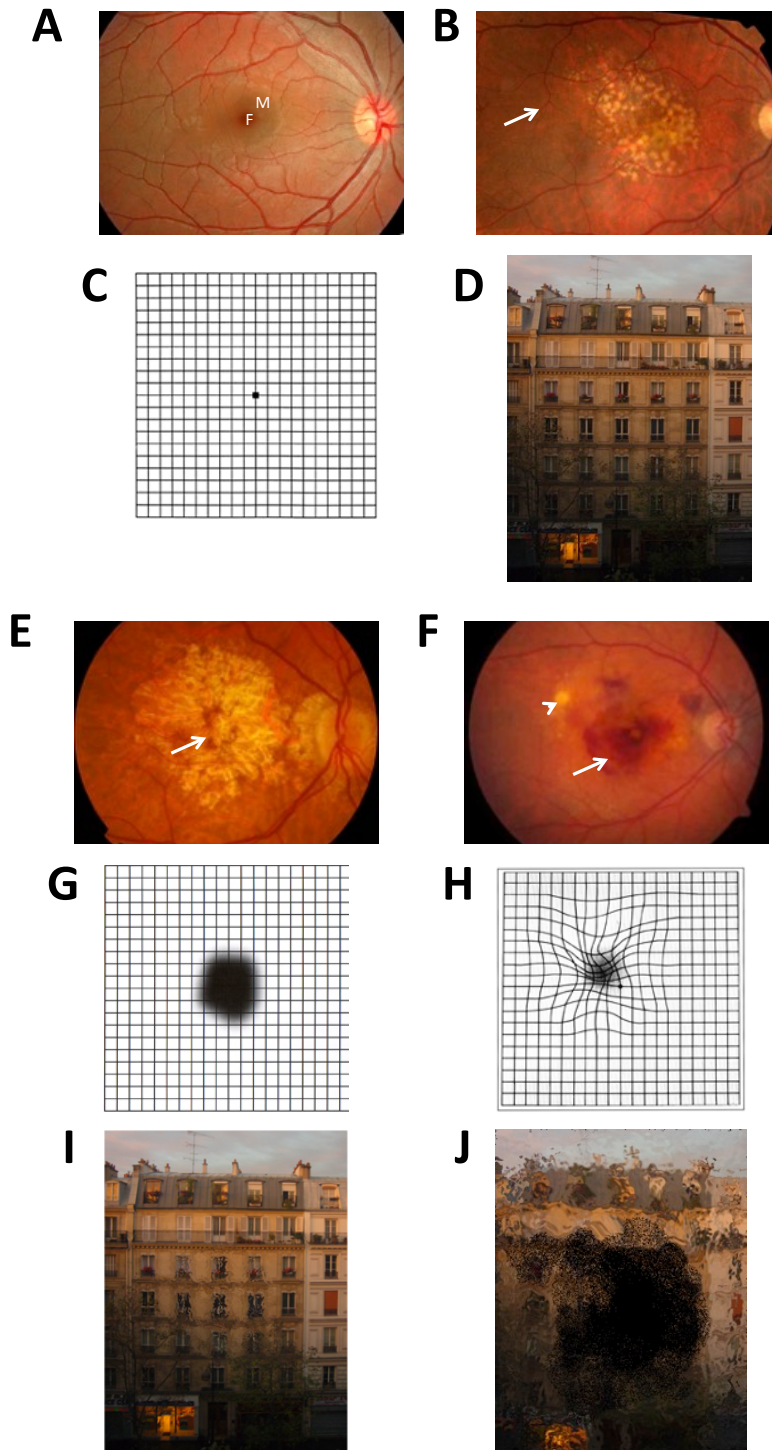


Figure 10 : La DMLA, une pathologie évolutive. Fonds d'œil d'un patient sain (A), présentant une maculopathie (B), une atrophie géographique (E), ou une DMLA humide (F). Le test de la grille d'Amsler permet de détecter les métamorphopsies (H), ou les zones de perte de vision (G), absentes chez le patient sain (C). Les photos représentent l'impact sur la vision de patients atrophiques (I) ou présentant une DMLA néo-vasculaire (J) par rapport à un patient sain (D). F : fovéa. M : macula.

La population atteinte par la DMLA est de 2% pour les moins de 60 ans, et de 30% pour les séniors de plus de 75% (Bernstein, 2009). Aux Etats-Unis, la maculopathie liée à l'âge concerne entre 5 et 7% des séniors de moins de 55 ans : mais pour les individus de plus de 75 ans, la prévalence augmente jusqu'à 25% (Friedman et al., 2004). Concernant les formes tardives de la DMLA, la prévalence atteint 8% chez les personnes de plus de 75 ans (Friedman et al., 2004). Les patients atteints de maculopathie asymptomatique et qui présentent des drusens soft larges ont 15 à 30% de chances de développer une forme tardive de la DMLA (Klein et al., 2004; Wang et al., 2003) avec 55% de risque de basculer vers la forme exsudative, et 45% vers la forme atrophique (Klein et al., 2002). La DMLA est donc enjeu de santé publique majeure, d'autant que la population des pays industrialisés est de plus en plus vieillissante. En 2004 aux Etats-Unis, 1,75 millions de personnes présentaient l'un des stades avancés de la DMLA, et 7,3 millions étaient au stade intermédiaire, avec donc une probabilité accrue de développer les formes tardives (National Eye Institute. Prevalence of Eye Disease Table. 2004). Malheureusement, il n'existe pas encore de traitements pour la forme sèche, et les traitements anti-VEGF utilisés dans la forme humide sont incapables de ralentir les conséquences neuro-dégénératives et la perte de la fonction visuelle associés à la croissance de vaisseaux chez 10% des patients (Rofagha et al., 2013).

2.2.2) Caractéristiques et symptômes

L'examen du fond d'œil est le moyen le plus rapide et le plus efficace d'observer la rétine d'un patient : il est réalisé sans douleur, et sans anesthésie. Chez les patients atteints de pathologies rétinienne, le fond d'œil permet le suivi du patient, et l'établissement d'un diagnostic, puisqu'il révèle la présence de néo-vaisseaux papillaires non-occulés, de fuites vasculaires, de drusens, ou d'un décollement de rétine.

La tomographie à cohérence optique, ou « optical coherence tomography » (OCT) est un examen non-invasif qui utilise la projection d'ondes lumineuses pour examiner la structure de la rétine : L'OCT permet au médecin d'analyser la structure et l'épaisseur des couches rétinienne.

Enfin, l'angiographie rétinienne permet d'apprécier au fond d'œil l'état de la vascularisation grâce à l'injection d'un composé fluorescent – la fluorescéine – dans la circulation sanguine.

Le praticien peut observer les lésions de l'atrophie géographique à l'aide de ces différentes techniques, et ainsi en identifier les particularités anatomiques, comme la visibilité accrue des vaisseaux choroïdiens observables au fond d'œil, l'absence de lipofuscine autofluorescente de l'EPR, ou l'hypertransmission lumineuse à travers les couches rétinienne observable en OCT. Au fond d'œil, les lésions atrophiques sont nettement visibles et se démarquent par l'aspect hypo-pigmenté de l'EPR, qui laisse transparaître les vaisseaux choroïdiens. En OCT, les lésions atrophiques sont généralement identifiées grâce à la perte des couches externes de la rétine –

correspondant à la dégénérescence de l'EPR et des photorécepteurs. Le phénomène d'hypertransmission choroïdienne causé par la disparition des structures absorbantes de la rétine externe peut permettre chez certains patients de délimiter plus précisément les bordures des zones atrophiques (Fleckenstein et al., 2010). L'examen à la fluorescéine permet aussi d'identifier les lésions atrophiques, qui sont définies dans les premières minutes du test par des zones hyperfluorescentes. Cette caractéristique est due à l'absence de l'EPR, qui permet de visualiser nettement le colorant fluorescent qui circule dans les vaisseaux choroïdiens. Le colorant finit ensuite par diffuser plus largement, rendant la détection précise des limites de la zone atrophiques plus compliquée.

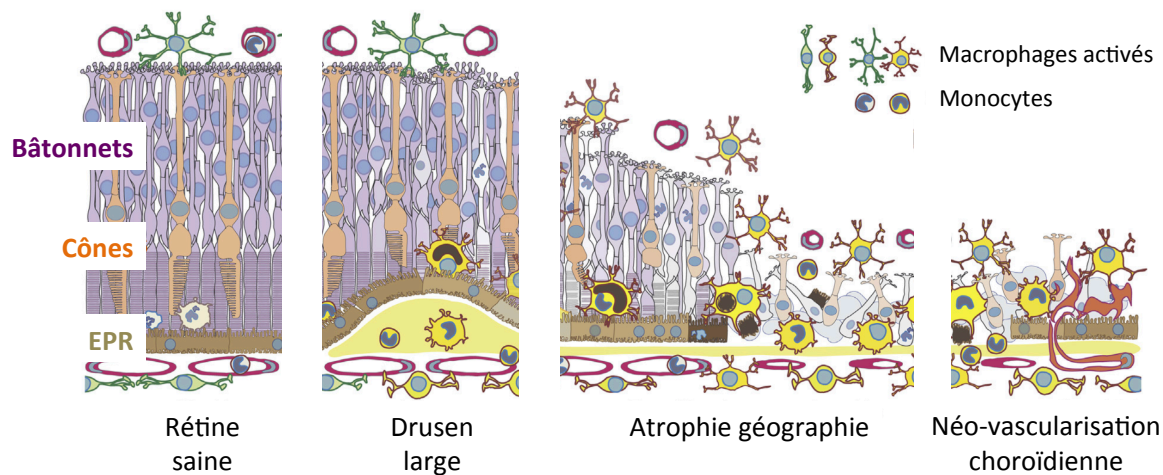


Figure 11 : Accumulation de phagocytes mononucléés dans la DMLA. Chez les patients sains, l'espace sous-rétinien est dépourvu de phagocytes mononucléés. Ceux-ci s'accumulent du côté apical de l'épithélium pigmentaire (EPR) autour des drusens larges, au niveau de la zone atrophique et de la zone de transition dans l'atrophie géographique, et à proximité des lésions vasculaires dans la DMLA humide, où ils phagocytent les débris et les pigments de l'EPR dégénèrescent.

(Guillonnet al, 2017, Progress in Retinal & Eye Research)

2.2.3) Les facteurs de risque

De nombreux facteurs de risque associés au développement de la DMLA ont été identifiés, en lien avec certains polymorphismes génétiques, l'origine ethnique, les habitudes alimentaires – carence en vitamines ou régime riche en graisses –, la condition physique – rythme de vie sédentaire, consommation de tabac, facteurs de risque cardiovasculaires – ou même en lien avec l'environnement, comme l'exposition prolongée à de fortes intensités lumineuses (Chakravarthy et al., 2010). Une partie de ces facteurs de risque est avérée, et les mécanismes qui les sous-tendent ont pu être en partie éclaircis, alors que d'autres présentent un lien mécanistique avec la DMLA qui reste encore obscur. Mais dans l'ensemble, de plus en plus d'indices révèlent la

contribution de ces facteurs de risque à une toxicité induite par les membres de la famille des phagocytes mononucléés (Figure 11).

2.2.3.1) Les facteurs de risque avérés en lien avec l'inflammation

Age : De toute évidence, le premier facteur de risque lié à la DMLA est l'âge. Le vieillissement impacte la régulation homéostatique à plusieurs niveaux via des mécanismes qui n'ont pas tous été explicités. Chez la souris, le vieillissement suffit à induire l'accumulation sous-rétinienne de phagocytes mononucléés (Damani et al., 2011), et cet effet est amplifié dans les modèles murins où la résolution de l'inflammation et l'élimination des macrophages sont inactivées (Calippe et al., 2017; Combadière et al., 2007; Levy et al., 2015a; Sennlaub et al., 2013).

En effet, le vieillissement est associé avec l'accroissement de la production de chimiokines dans l'œil comme le CCL2, favorisant le recrutement de monocytes circulants (Sennlaub et al., 2013), et avec la perte des propriétés immunosuppressives de l'espace sous-rétinien, prévenant la résolution de l'inflammation (Damani et al., 2011). De plus, les monocytes circulants des sujets âgés présentent une production accrue de cytokines (Hearps et al., 2012). Enfin, des expériences de transplantation de moelle osseuse de souris âgées dans des souris plus jeunes ont montré que la forte néo-vascularisation induite par impact laser dépendait des cellules dérivées de la moelle (Zhao et al., 2013).

Ces résultats montrent l'impact majeur qu'a le vieillissement du système immunitaire dans la pathogénèse de la DMLA (Figure 11).

Prédisposition génétique : La DMLA est une pathologie héréditaire : le seul fait d'avoir un parent atteint augmente le risque de développer la DMLA d'un facteur 5 à 10 (Chakravarthy et al., 2010). L'étude la plus récente montre que 52 variants génétiques indépendants et répartis sur 34 loci sont associés à la DMLA (Figure 12 A) : 16 de ces loci incluent des gènes majoritairement associés au métabolisme lipidique ou à l'inflammation (Fritsche et al., 2015). Plusieurs autres études ont montré que le risque génétique associé à la DMLA est dû à certaines isoformes d'ApoE (Fritsche et al., 2015; Swaroop et al., 2007) et de CFH (Fritsche et al., 2013, 2014; Magnusson et al., 2006) ainsi qu'à l'allèle à risque 10q26 (Swaroop et al., 2007; Yang et al., 2006). Ces gènes étant tous exprimés par les macrophages (Figure 12B), leurs différents variants impactent leurs fonctions et favorisent la promotion de l'inflammation, très certainement indépendamment de la dégénérescence de l'EPR, de la choroïde ou des photorécepteurs.

Les mécanismes inflammatoires induits par l'expression de ces facteurs de risque par les macrophages, et la manière dont ils favorisent le déséquilibre d'une réaction inflammatoire initialement bénéfique seront détaillés au chapitre « 2.3.2) Rôle des facteurs de risque génétique ».

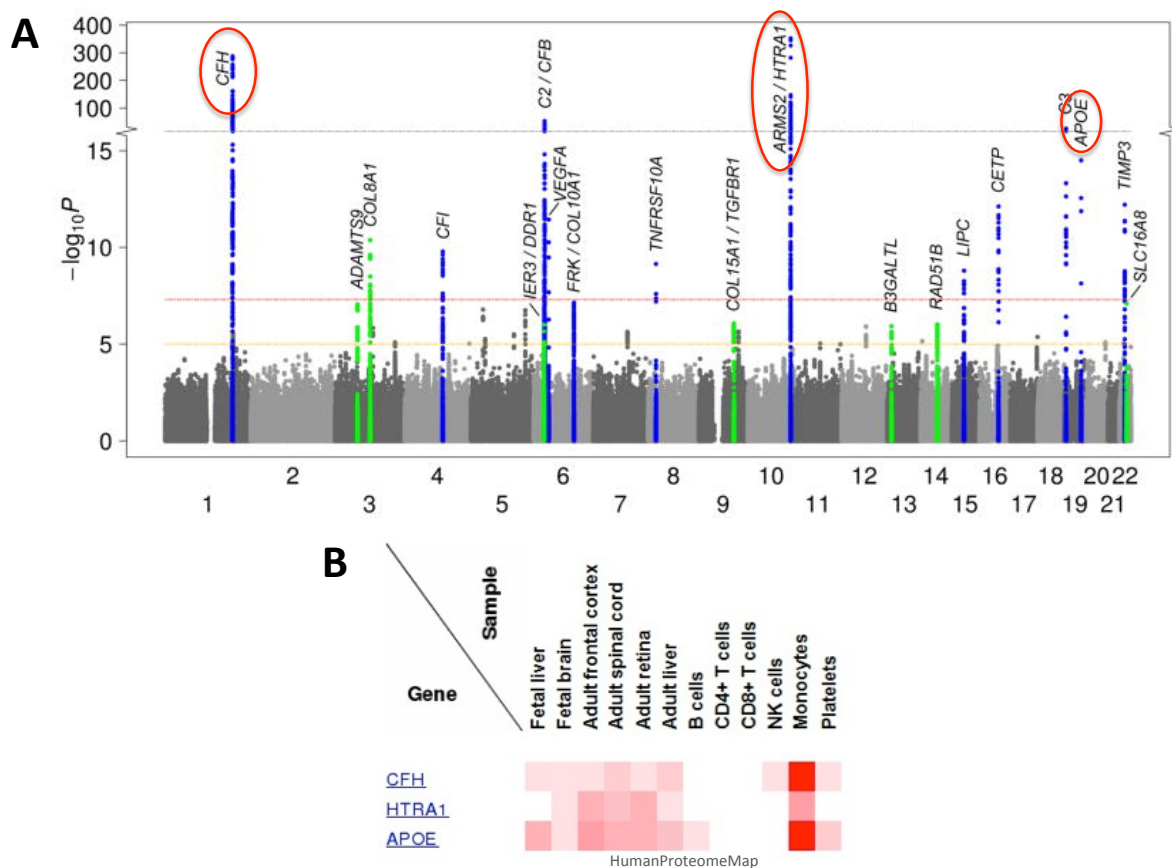


Figure 12 : Les variants génétiques associés à la DMLA influencent l'inflammation. Les variants génétiques des gènes APOE, CFH et HTRA1 sont fortement associés à la DMLA (A). APOE, CFH et HTRA1 sont fortement exprimés par les phagocytes mononucléés (B).

(D'après Fritsche et al, 2015, Nature Genetics)

2.2.3.2.) Les facteurs de risque environnementaux

Cigarette : Les fumeurs ont entre 2,6 et 4,8 fois plus de probabilité de développer l'une des formes tardives de la DMLA, et les anciens fumeurs sont eux aussi exposés à un risque accru, avec une probabilité 1,7 fois supérieure (Chakravarthy et al., 2007). Les mécanismes qui lient la consommation de cigarette à la DMLA ont malheureusement été assez peu explorés jusqu'à ce jour.

Exposition à la lumière : L'exposition prolongée à une forte intensité lumineuse a aussi été associée chez les patients à un accroissement du risque de développer la forme précoce et la forme tardive de la DMLA (Fletcher et al., 2008; Schick et al., 2016). Mais les mécanismes qui lient ces deux évènements n'ont pas été clairement élucidés.

Obésité : Les résultats de plusieurs études menées sur d'importantes cohortes de patients suggèrent que l'obésité est un important facteur de risque pour la DMLA.

L'étude de la Melbourne Collaborative Cohort a montré que l'obésité abdominale chez les hommes accroît de 13% le risque de développer une DMLA précoce, et de 75% pour la DMLA tardive (Adams et al., 2011). De même, une autre étude a montré que la réduction du ratio taille/hanches – qui permet d'évaluer l'obésité abdominale – chez les individus d'âge moyen était associée à une diminution de 3% du risque de développer la DMLA, particulièrement chez les personnes en surpoids (Peeters et al., 2008).

2.2.4) Traitements

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement pour l'atrophie géographique, ni pour ralentir, ni pour inverser sa progression. Une étude clinique de phase 3 conduite par Roche et dont les premiers résultats sont attendus pour septembre 2018 a pour but d'évaluer l'effet d'un nouveau médicament, le Lampalizumab. Ce traitement, administré par injection intra-vitréenne est censé ralentir la progression de la lésion atrophique, en inhibant la voie alternative du complément via le facteur D. Ce traitement présente des effets prometteurs (Yaspan et al., 2017), même si une précédente étude clinique conduite par Genentech n'a pas donné les effets escomptés. D'autres pistes thérapeutiques sont actuellement explorées, comme la transplantation de cellules souches, l'utilisation d'implants rétiniens, ou l'inhibition du facteur 3 du complément.

Concernant la DMLA exsudative, les perspectives thérapeutiques sont moins sombres puisqu'il existe au moins deux traitements : (i) la thérapie photo-dynamique, aujourd'hui délaissée au profit de (ii) la thérapie anti-VEGF. La thérapie photo-dynamique (PDT) avait été établie comme une alternative sûre et efficace pour traiter la DMLA humide (Bressler and Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy (TAP) Study Group, 2001). Il s'agit d'une photothérapie par laser, qui consiste à générer des radicaux libres dans le tissu sous-rétinien. Ces radicaux libres ont un effet cytotoxique sur les vaisseaux néo-formés, et permettent la régression de la néo-vascularisation après injection intraveineuse d'un agent photosensible, la vertéporfine. Cette thérapie avait été abandonnée après la découverte de l'efficacité des thérapies anti-VEGF, mais certaines études ont montré un effet positif des deux thérapies combinées (Koh et al., 2012).

A l'heure actuelle, ce sont les traitements anti-VEGF qui sont les plus utilisés. Le ranibizumab est un fragment d'anticorps monoclonal qui inhibe le VEGF et prévient la néo-vascularisation choroïdienne. Il est autorisé par la FDA dans le traitement de la DMLA exsudative (Agarwal et al., 2015). L'aflibercept est une protéine recombinante de fusion, composée d'une portion des récepteurs 1 et 2 au VEGF (VEGFR-1 et VEGFR-2) fusionnées au niveau du domaine Fc de l'immunoglobuline humaine G1. Ce composé présente une plus haute affinité que le ranibizumab pour piéger le VEGF et former un complexe inerte stable (James A Dixon, Scott CN Oliver, Jeffrey L Olson, 2009). Ce médicament présente un avantage certain de part son efficacité, et sa demi-vie plus longue permettant de réduire le rythme des injections. Enfin, le bevacizumab est un

anticorps monoclonal humain recombinant, qui se lie au VEGF et l'inhibe (Baka et al., 2006). Il se différencie du ranibizumab par la présence du domaine Fc, mais est moins cher, ce qui en fait un traitement alternatif permettant de réduire le coût de la prise en charge de la DMLA néo-vasculaire (Haller, 2013).

2.3) Inflammation dans la DMLA

2.3.1) Le système des phagocytes mononucléés

2.3.1.1) Progéniteurs, monocytes et macrophages

2.3.1.1.1) Origine des monocytes

Le système des phagocytes mononucléés est décrit comme un sous-groupe des leucocytes : c'est une population de cellules myéloïdes dérivées de progéniteurs localisés dans la moelle. Nous décrivons ici ce système en rapport avec le système nerveux central. Dans le SNC, le système des phagocytes mononucléés comprend les monocytes (Mos), les macrophages inflammatoires dérivés des monocytes (iMF), les cellules dendritiques (CDs), et les macrophages résidents (rMF) incluant les microglies (MCs).

De manière générale, les monocytes circulant dans le sang sont recrutés au niveau des tissus où ils se différencient en macrophages, en conditions basales comme dans le cadre d'une inflammation locale (van Furth, 1976). On observe cependant de grandes disparités relatives à l'origine des macrophages résidents selon les tissus : le SNC par exemple est intégralement colonisé au cours du développement par des progéniteurs provenant du sac vitellin, donnant la population de microglies qui persiste jusqu'à l'âge adulte (Ginhoux et al., 2010b). D'autres tissus comme les poumons sont colonisés par les macrophages dérivés de progéniteurs embryonnaires provenant de la moelle ou du sac vitellin (Guilliams et al., 2013). Enfin, certains organes comme le cœur sont colonisés au cours du développement, et leur population en macrophages est progressivement renouvelée au cours de la vie par l'invasion de macrophages CCR2+ dérivés de la moelle, ainsi que par auto-renouvellement (Epelman et al., 2014). Selon leur origine, les macrophages présentent une grande hétérogénéité de phénotypes et de fonctions, notamment dans la manière dont ils répondent à une blessure ou un stress inflammatoire. C'est pourquoi il est important de différencier dans le SNC les macrophages résidents des macrophages inflammatoires recrutés à partir des monocytes circulants dans le cadre de l'inflammation.

Les cellules de la lignée myéloïde proviennent d'un progéniteur commun : la cellule souche hématopoïétique (HSC) (Figure 13). Les HSCs se différencient en progéniteurs

myéloïdes communs (CMPs), qui donnent à leur tour les précurseurs aux granulocytes et macrophages, ou myéloblastes (GMPs). Ceux-ci se différencient enfin en progéniteur commun aux cellules dendritiques et aux monocytes (MDPs), qui donnent naissance aux monocytes et aux cellules dendritiques (Geissmann et al., 2010). Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes qui régulent l'immunité adaptative en modulant la réponse de lymphocytes T. Elles ne sont pas présentes en nombre représentatif dans la rétine : leurs caractéristiques ne seront donc pas décrites plus en détail ici, et nous nous focaliserons sur les monocytes circulants.

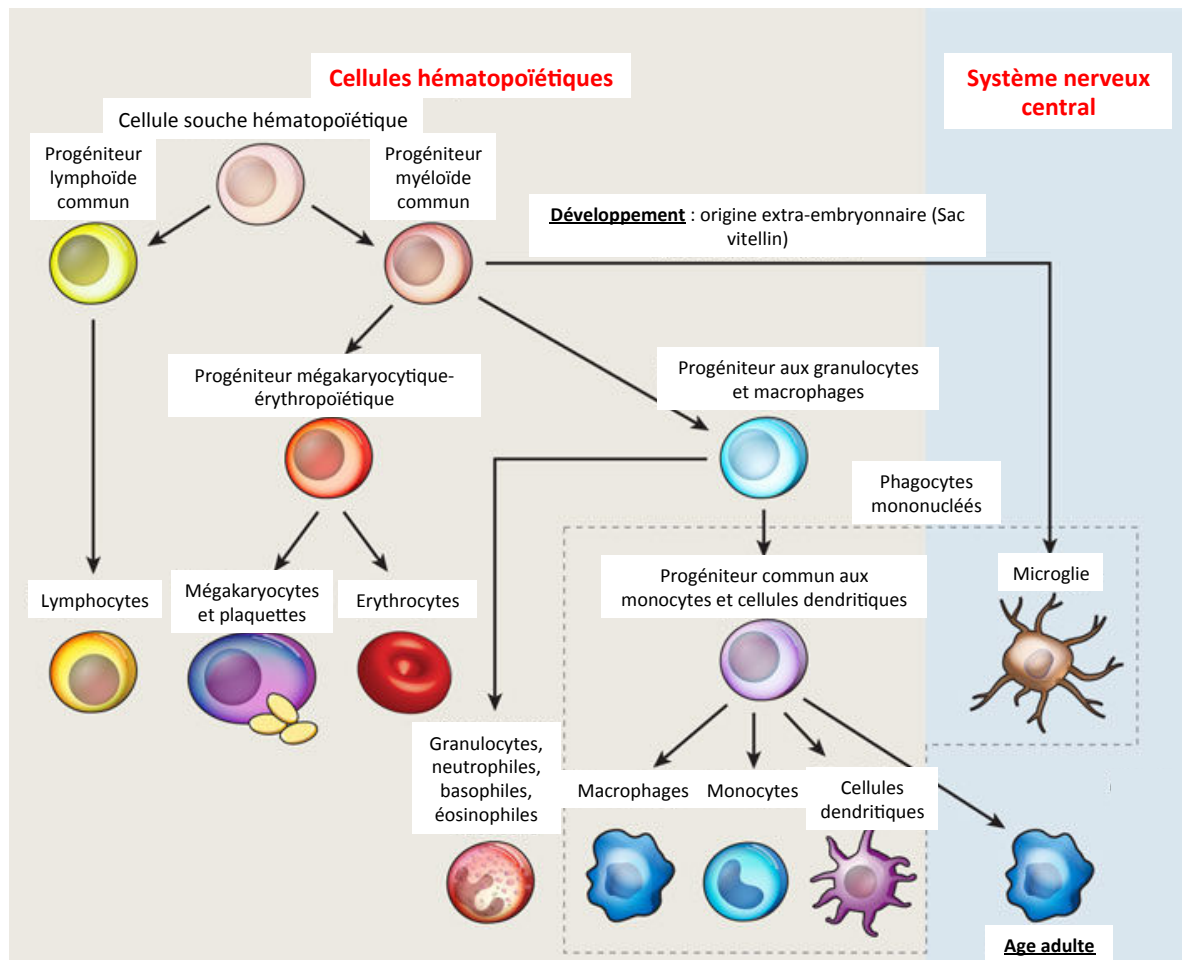


Figure 13 : Origine et différenciation des monocytes. Les monocytes et les macrophages sont issus de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques au cours du développement et à l'âge adulte. Les microglies - macrophages résidents du système nerveux central - proviennent de la différenciation de précurseurs présents dans le sac vitellin au cours du développement.

(D'après Ransohoff, 2010, Nature Reviews)

2.3.1.1.2) Les monocytes

Les monocytes circulants expriment un large panel de récepteurs aux chimiokines et aux motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) qui conditionnent leur recrutement (Serbina et al., 2008). Les monocytes sont capables de produire une grande quantité de molécules pro-inflammatoires, et peuvent se différencier en CD4 ou en macrophages lorsqu'ils sont recrutés au sein d'un tissu durant l'inflammation (Randolph et al., 1999).

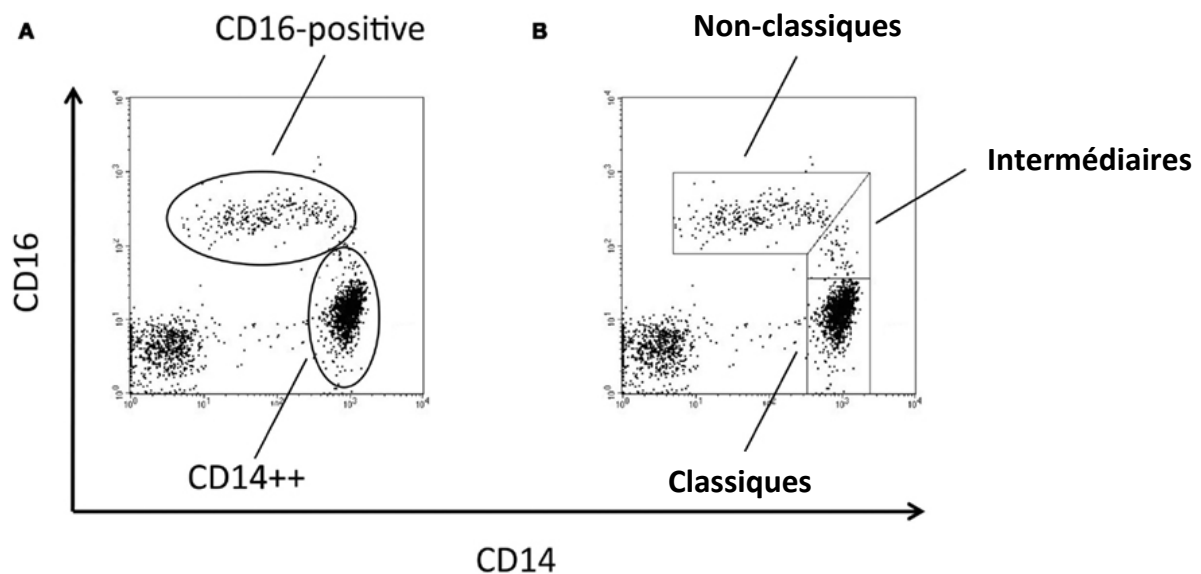


Figure 14 : Les marqueurs CD14 et CD16 permettent d'identifier les sous-populations de monocytes.

(D'après Ziegler-Heitbrock et al, 2013, Frontiers in Immunology)

Chez l'homme, il existe trois populations de monocytes circulants (Figure 14), définies par l'expression différentielle des marqueurs de surface CD14 et CD16 (Ziegler-Heitbrock et al., 2010) : (i) Les monocytes classiques expriment fortement CD14 mais pas CD16 (CD14++CD16-), (ii) les monocytes non-classiques expriment fortement CD16 et faiblement CD14 (CD14+CD16++), et (iii) les monocytes intermédiaires expriment de hauts niveaux de CD14 et de faibles niveaux de CD16 (CD14++CD16+). On retrouve une classification similaire chez la souris, avec des monocytes classiques Ly6C^{high}CCR2^{high}CX3CR1^{low}, alors que les monocytes non-classiques ont un profil Ly6C^{low}CCR2^{low}CX3CR1^{high} (Geissmann et al., 2010; Si et al., 2010). Ces profils d'expression de CCR2 et CX3CR1 sont identiques chez l'homme, mais ne sont pas utilisés pour identifier les sous populations de monocytes car ils ne permettent pas de caractériser la population de monocytes intermédiaires.

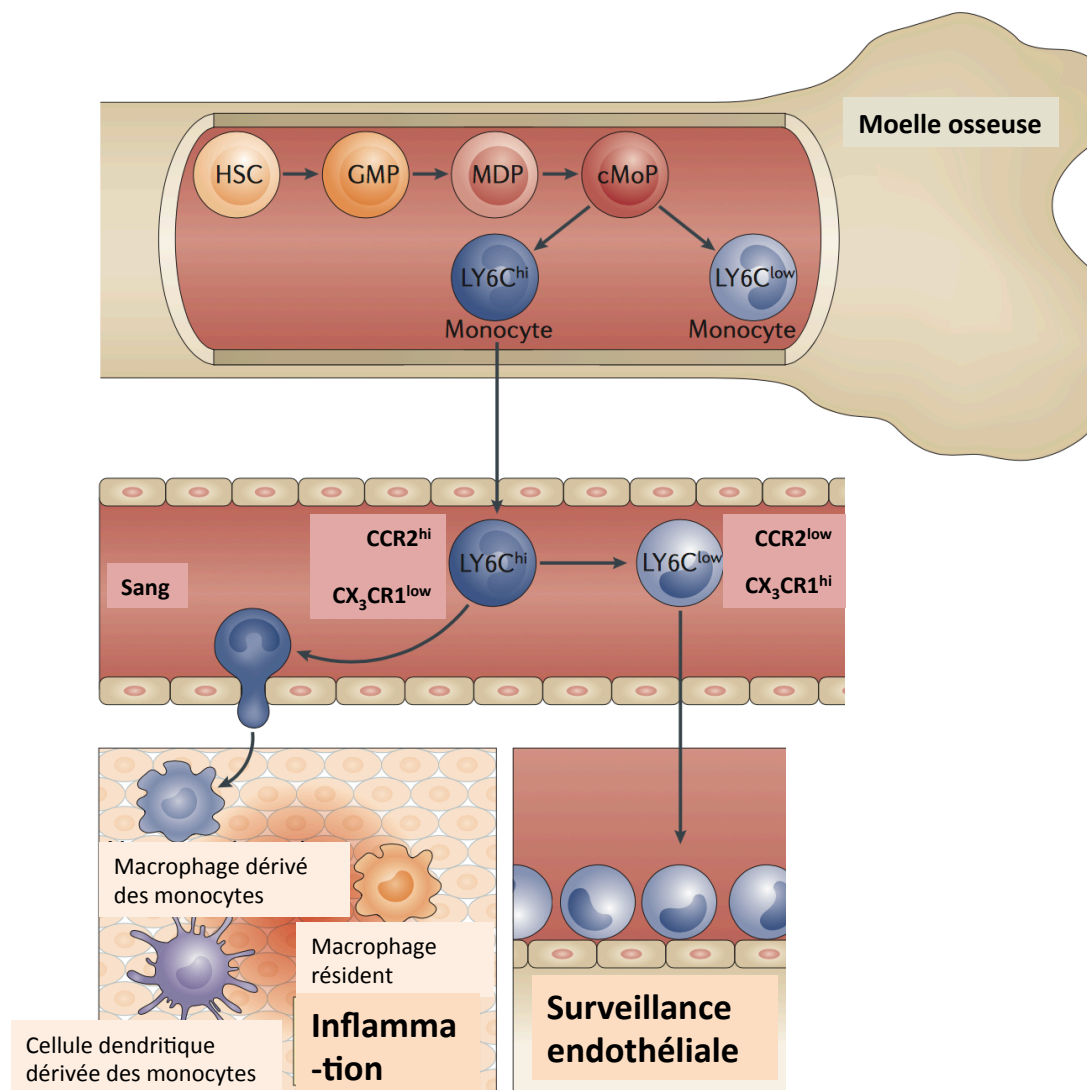


Figure 15 : Origine des macrophages chez la souris. Les monocytes sont continuellement générés à partir des cellules souches de la moelle osseuse. Les monocytes classiques sont recrutés au niveau des tissus en cas d'inflammation, où ils se différencient en macrophages inflammatoires. Les monocytes non-classiques patrouillent le long de l'endothélium vasculaire, et favorisent le recrutement des neutrophiles.

(D'après Ginhoux et al, 2014, Nature Review Immunology)

Les monocytes classiques ou inflammatoires répondent fortement à l'activation du Toll-like receptor 4 (TLR4) induite via le LPS, en produisant des cytokines inflammatoires : IL-6, IL-8, CCL2 (Chow et al., 1999). Ils interviennent dans la première ligne de défense contre les pathogènes (Figure 15), et jouent un rôle essentiel dans de nombreuses pathologies inflammatoires (Chuluundorj et al., 2014; Reed-Geaghan et al., 2010). Les monocytes non-classiques ont un rôle de « patrouilleur » : ils évoluent le long des vaisseaux sanguins, et activent des mécanismes dépendants de CX3CR1 et de l'intégrine LFA-1, permettant une invasion rapide du tissu par les monocytes classiques en cas de dommage ou d'infection (Auffray et al., 2007). Enfin, les monocytes intermédiaires qui sont particulièrement difficiles à identifier demeurent relativement peu étudiés, mais

semblent jouer un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire (Figure 15) dirigée contre les parasites (Turner et al., 2014) ou impliquée dans l'asthme (Moniuszko et al., 2009).

2.3.1.1.3) Les macrophages

Les macrophages résidents – par opposition aux macrophages inflammatoires recrutés à partir du pool de monocytes circulants – jouent un rôle de sentinelle et fournissent un soutien trophique : ils sont présents dans presque tous les tissus, qu'ils colonisent le plus souvent au cours du développement, en se différenciant à partir des monocytes du sac vitellin ou provenant du foie (Gautier and Yvan-Charvet, 2014). Dans la rétine les macrophages résidents sont les microglies, qui interviennent au cours de la formation des synapses, éliminent les neurones apoptotiques ... : les caractéristiques des microglies sont détaillées dans le paragraphe « 1.2.2.2.3.2) Les microglies résidentes ».

Il faut différencier les macrophages résidents des macrophages recrutés lors d'une réaction inflammatoire, et qui sont théoriquement présents de manière transitoire, et éliminés lors de la résolution de l'inflammation. Ces macrophages dérivent de la population de monocytes CCR2+ (Figure 15), et se différencient en rejoignant le site de l'inflammation (Geissmann et al., 2003). Ces macrophages présentent une taille plus importante que les monocytes, et interviennent dans l'inflammation, la phagocytose, le remodelage tissulaire et la cicatrisation : ils possèdent donc une machinerie cellulaire très développée et sont très plastiques (Mantovani et al., 2005).

2.3.1.2) Accumulation chronique des macrophages dans la DMLA

2.3.1.2.1) Les origines de l'inflammation chronique

Les phagocytes mononucléés sont les médiateurs d'une inflammation de bas-grade, théoriquement censée maintenir les fonctions tissulaires. Ils interviennent pour éliminer les pathogènes, ou détruire par phagocytose les débris toxiques extracellulaires. Par exemple, le recrutement de monocytes inflammatoires peut être bénéfique vis-à-vis de la survie des photorécepteurs dans certains cas extrêmes, comme l'élimination de doses toxiques de β -amyloïde exogène (Bruban et al., 2011). Dans la plupart des cas, l'inflammation finit par se résoudre : mais si elle n'est pas rapidement contrôlée, ou si la situation homéostatique ne retourne pas à un équilibre physiologique, elle peut persister sur un plus long terme. Cet état, défini comme une « para-inflammation » (Medzhitov, 2008) pourrait intervenir dans les phases les plus précoces de la DMLA, où les macrophages s'accumulent autour des drusens pour participer à l'élimination des débris. La concordance de plusieurs facteurs de risque, comme par exemple une baisse de l'efficacité homéostatique associée à un polymorphisme

défavorisant la résolution de l'inflammation, pourrait alors susciter l'installation d'une inflammation chronique, avec des conséquences neuro-toxiques.

2.3.1.2.2) Le recrutement des macrophages

A l'état basal, on ne trouve aucun phagocyte mononucléé (PMs) dans la couche des photorécepteurs ou l'espace sous-rétinien, mais ceux-ci s'accumulent avec l'âge chez les patients atteints de DMLA. Il est très difficile de distinguer les différentes sous-populations de PMs, compte-tenu du fait qu'ils expriment des marqueurs similaires, mais on peut différencier les microglies CCR2- (Mizutani et al., 2012) des macrophages inflammatoires CCR2+ (Saederup et al., 2010).

CCL2 est le ligand du récepteur CCR2 : son expression est induite par les microglies en réponse à un signal de danger, mais CCL2 est aussi produite par les macrophages inflammatoires (Sennlaub et al., 2013), les cellules gliales de Müller (Rutar et al., 2012) et l'EPR (Chen et al., 2008). L'expression de CCL2 dans la rétine augmente avec l'âge (Nakazawa et al., 2007) ainsi que chez les patients atteints de DMLA néo-vasculaire et atrophique (Newman et al., 2012).

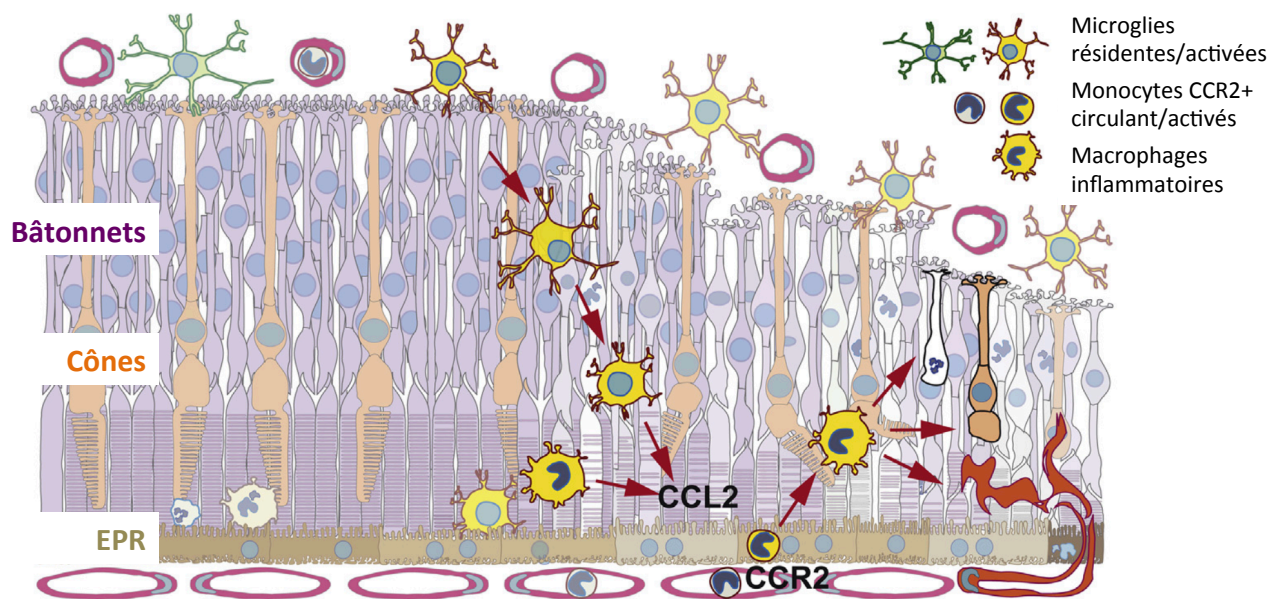


Figure 16: L'accumulation de macrophages inflammatoires est associée à la dégénérescence rétinienne. Chez les patients présentant une DMLA atrophique ou néo-vasculaire, les macrophages activés sur-expriment la chimiokine CCL2, favorisant le recrutement des macrophages inflammatoires supplémentaires.

(Guillonnet et al, 2017, Progress in Retinal & Eye Research)

A cet égard, il est intéressant de noter que les patients qui présentent une atrophie géographique arborent la présence de macrophages CCR2+ au niveau des drusens, des zones de lésions atrophiques, et de leur zone de transition (Sennlaub et al., 2013). De plus, la délétion de *Ccr2* ou *Ccl2* dans des modèles d'inflammation sous-rétinienne

induite chez la souris déficiente en Cx3cr1 entraîne une diminution de 50% du nombre de macrophages sous-rétiniens, associée à une réduction de la dégénérescence des photorécepteurs (Sennlaub et al., 2013). Ces résultats montrent la contribution neurotoxique des macrophages inflammatoires recrutés de manière CCR2-dépendante (Figure 16).

La distribution normale des microglies est aussi perturbée au cours du vieillissement et dans certaines pathologies. Dans la rétine âgée, le nombre de microglies activées présentes dans la rétine externe et l'espace sous-rétinien a tendance à augmenter (Xu et al., 2008, 2009). Chez les patients, la présence de microglies est aussi associée au développement de lésions avancées liées à la DMLA (Gupta et al., 2003). De plus, dans des modèles de DMLA induits chez des souris Cx3cr1^{GFP/GFP}, la présence de microglies accumulées dans l'espace sous-rétinien a été associée à la dégénérescence de l'EPR, l'atrophie des photorécepteurs et la néo-vascularisation choroïdienne (Combadière et al., 2007). On sait que les microglies peuvent aussi participer à la dégénérescence des photorécepteurs chez les souris rd10 – qui sont des modèles de rétinite pigmentaires (Zabel et al., 2016; Zhao et al., 2015).

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que l'accumulation sous-rétinienne de microglies activées pourrait perturber l'homéostasie tissulaire, et promouvoir une inflammation chronique, conduisant à l'apparition d'altérations caractéristiques de la DMLA.

2.3.2) Rôles des facteurs de risques génétiques

Comme nous l'avons vu, la DMLA est une pathologie multifactorielle, associée à plusieurs facteurs de risque, y compris génétiques. Nous avons aussi vu que la progression de la maladie est associée à la présence de phagocytes mononucléés dans l'espace sous-rétinien, à proximité des drusens et des zones de lésion atrophique. Mais il est compliqué de déterminer si la réaction inflammatoire chronique est l'événement primaire qui induit la pathologie, ou s'il s'agit d'un événement secondaire associé à la dégénérescence. Nous proposons ici de confronter les données présentes dans la littérature avec celles publiées par notre équipe, afin d'établir un lien mécanistique entre les polymorphismes génétiques associés à la DMLA et le comportement des macrophages, et de montrer comment ces facteurs de risque affectent la fonctions des PMs.

2.3.2.1) Apolipoprotéine E

La lipoprotéine APOE est très fortement exprimée dans le cerveau et la rétine (Anderson et al., 2001). Plus précisément, APOE est produite par l'EPR (Ishida et al., 2004), et par les phagocytes mononucléés, comme les macrophages et les microglies (Levy et al., 2015a; Peri and Nüsslein-Volhard, 2008). APOE joue un rôle majeur dans l'efflux

lipidique et le transport inverse du cholestérol (Mahley et al., 2009) qui permet de reconduire au foie les lipoprotéines de haute densité pour qu'elles y soient dégradées.

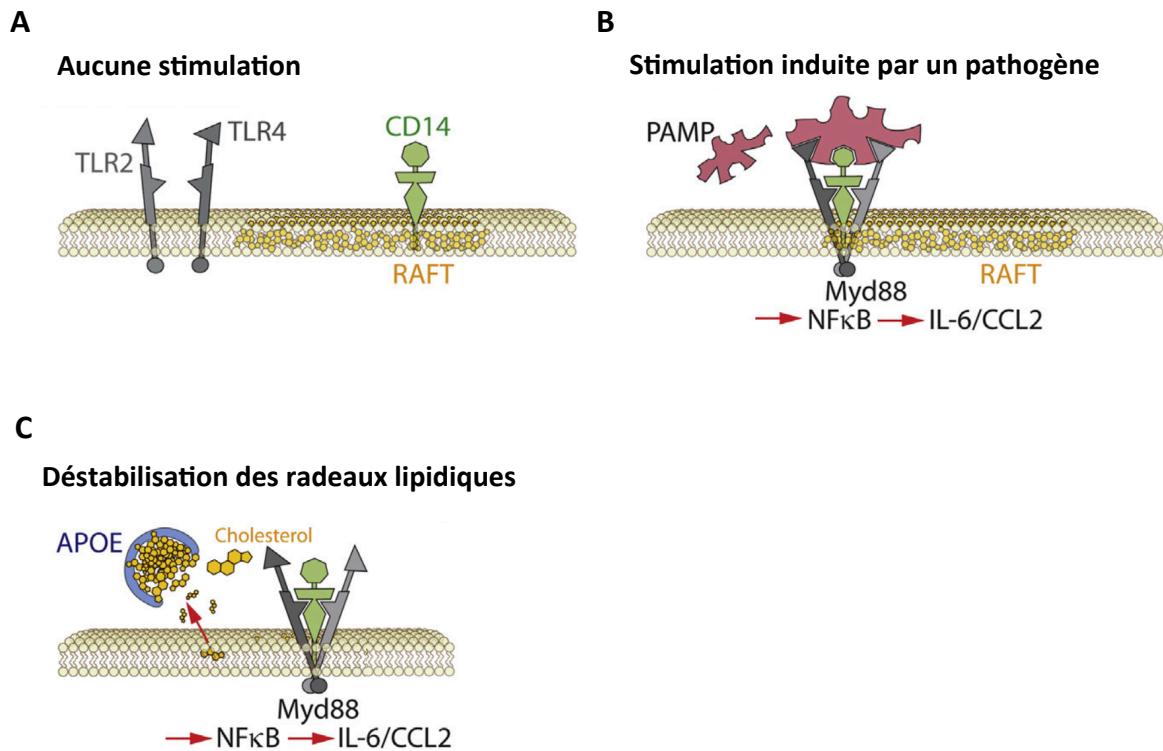


Figure 17 : Représentation schématique de l'activation du cluster de récepteurs liés à l'immunité innée (IIRC) par l'apolipoprotéine E.

Chez l'homme, le gène codant l'expression de l'Apolipoprotéine E possède trois variants génétiques : APOE2, APOE3 et APOE4. Les individus porteurs de l'allèle APOE2 présentent un risque élevé de développer une forme tardive de DMLA, alors que l'allèle APOE4 semble être un facteur protecteur (Mckay et al., 2011), contrairement à ce qui est observé dans d'autres pathologies comme la maladie d'Alzheimer (Bell et al., 2012) ou l'athérosclérose (Mahley and Rall, 2000). Dans la DMLA, les drusens larges présentent une forte accumulation d'APOE (Klaver et al., 1998), ainsi qu'une grande quantité de cholestérol extracellulaire (Curcio et al., 2001; Pikuleva and Curcio, 2014). On pourrait penser qu'un défaut du transport inverse du cholestérol serait la cause du développement des drusens, par accumulation de lipides, mais c'est l'inverse qui se produit. En effet, l'isoforme APOE4, qui dans le cerveau est associée à une baisse de la sécrétion d'APOE (Riddell et al., 2008; Sullivan et al., 2011) et à une diminution du transport inverse du cholestérol, diminue le risque de développer la DMLA (Mckay et al., 2011). L'explication de cette corrélation est liée à une particularité des phagocytes mononucléés : APOE et le cholestérol sont en effet capables influencer l'immunité innée en activant un cluster de récepteurs liés à l'immunité innée (Abrégé « IIRC ») présents à la surface des macrophages (Figure 17 A). Ce cluster est formé par les Toll-like

récepteurs TLR2 et TLR4, ainsi que leurs corécepteurs - comme CD14 - et peut induire la production de cytokines inflammatoires. Une quantité excessive d'APOE peut ainsi induire une extraction massive de cholestérol à partir des radeaux lipidiques membranaires, surpassant la séparation physiologique des récepteurs composant l'IIRC (Figure 17 C), et activant ainsi les voies de signalisation intracellulaires qui en découlent (Levy et al., 2015a; Smoak et al., 2010). Cette activation induit ensuite la production de cytokines inflammatoires, comme IL-6 qui réprime l'effet immunosuppresseur de l'EPR, favorisant la survie et l'accumulation de macrophages (Levy et al., 2015a), et CCL2 qui permet de recruter des macrophages supplémentaires via un mécanisme CCR2-dépendant (Sennlaub et al., 2013).

L'effet distinct des différentes isoformes d'APOE a été confirmé in vivo par Levy et al. L'utilisation de souris exprimant l'isoforme humaine d'APO2 (Souris TRE2) a permis de reproduire l'accumulation sous-rétinienne de macrophages via l'activation du cluster IIRC, et la production d'IL-6 et CCL2 (Levy et al., 2015b) comme observée chez la souris Cx3cr1^{GFP/GFP} (Levy et al., 2015a). L'isoforme APOE4, moins efficace pour extraire le cholestérol des radeaux lipidiques, conduit à une diminution de l'expression de CCL2, permettant une meilleure protection contre la dégénérescence induite par l'inflammation sous-rétinienne (Levy et al., 2015b).

Dans l'ensemble, ces résultats montrent la très forte association qui lie les polymorphismes APOE-dépendants et l'activation excessive du système immunitaire inné dans le développement de caractéristiques phénotypiques associées à la DMLA.

2.3.2.2) Facteur H du Complément

Le système du complément est un groupe de protéines qui interagissent en cascade, jusqu'à aboutir à son opsonisation et la formation d'un complexe d'attaque membranaire, créant des pores dans sa membrane plasmique (Sarma and Ward, 2011). Les facteurs du complément sont majoritairement synthétisés par le foie et libérés en concentrations importantes dans la circulation, mais les macrophages libèrent des sécrétions locales contenant aussi ces facteurs (Ezekowitz et al., 1984). Le facteur H du complément est une protéine appartenant à ce système, et qui est connue pour être l'un des éléments inhibant la voie alternative du complément (Zipfel and Skerka, 2009). Le CFH est exprimé par les cellules de l'EPR (Anderson et al., 2010), et est aussi fortement sécrété par les phagocytes mononucléés (Luo et al., 2011; Schlaf et al., 2001). Le CFH se lie aussi à l'intégrine CD11b/CD18, et induit entre autres la phagocytose des débris opsonisés par le CFH : cet événement n'est pas associé à la production de cytokines inflammatoires, et est un composant important de la résolution de l'inflammation (DiScipio et al., 1998; Kang et al., 2012). Le CFH est donc impliqué dans la résolution de l'inflammation.

Le risque de développer la DMLA est associé avec le polymorphisme nucléotidique rs1061170 du gène codant le CFH (Edwards et al., 2005; Hageman et al., 2005). Ce

polymorphisme conduit à une substitution d'une histidine pour une tyrosine en position 402 du domaine SCR7. Ce polymorphisme est associé aux formes tardives de la DMLA (Fritsche et al., 2013; Seddon et al., 2007), mais aussi à la forme précoce (Fritsche et al., 2014) ce qui suggère qu'il est impliqué dans un mécanisme précoce impliqué dans le déclenchement de la maladie.

Nous avons très récemment publié un article mettant en évidence un rôle assez surprenant du CFH dans la pathogénèse de la DMLA (Calippe et al., 2017). Nos résultats démontrent que la déficience en CFH chez les souris Cx3cr1^{GFP/GFP} et TRE2 inhibe complètement l'accumulation sous-rétinienne de macrophages et les dommages aux photorécepteurs qui y sont associés. Plus précisément, le CFH dérivé des macrophages inhibe la résolution de l'inflammation dans nos modèles d'inflammation sous-rétinienne induite par exposition à la lumière et transfert adoptif. Or, comme nous l'avons vu précédemment, le récepteur CD47 exprimé par les macrophages permet leur élimination grâce à l'interaction avec TSP-1. Nous montrons ici que CD47 interagit avec l'intégrine CD11b/CD18 à la surface des macrophages, et que CFH en se liant à son récepteur intégrine, prévient l'élimination des macrophages par TSP-1 (Figure 18), et donc la résolution de l'inflammation (Calippe et al., 2017).

L'ensemble de ces données suggère une fois encore qu'un polymorphisme associé à la DMLA favorise son développement via un mécanisme lié aux phagocytes mononucléés induisant la promotion d'une inflammation chronique sous-rétinienne.

2.3.2.3) ARMS2/HTRA1

De nombreuses études ont montré que plusieurs polymorphismes associés à des gènes situés sur le chromosome 10q26, comme ARMS2 ou HTRA1, sont associés avec la DMLA (Swaroop et al., 2007), bien qu'on n'en connaisse pas encore le lien de causalité (Wang, 2014).

Il semble que l'haplotype à risque soit associé à une surexpression d'HTRA1 (Yang et al., 2006). Or, la déficience en HTRA1 inhibe l'accumulation associée à l'âge de macrophages sous-rétiniens (Données non publiées), ce qui suggère que l'expression d'HTRA1 promeut l'inflammation sous-rétinienne, mais les mécanismes moléculaires précis demeurent inconnus.

De plus, l'haplotype à risque est associé à une diminution de l'expression d'ARMS2 (Données non publiées) et ARMS2 semble favoriser l'élimination des débris cellulaires par osponisation (Micklisch et al., 2017) : la déficience en ARMS2 pourrait entraîner l'accumulation de débris et favoriser aussi l'inflammation sous-rétinienne.

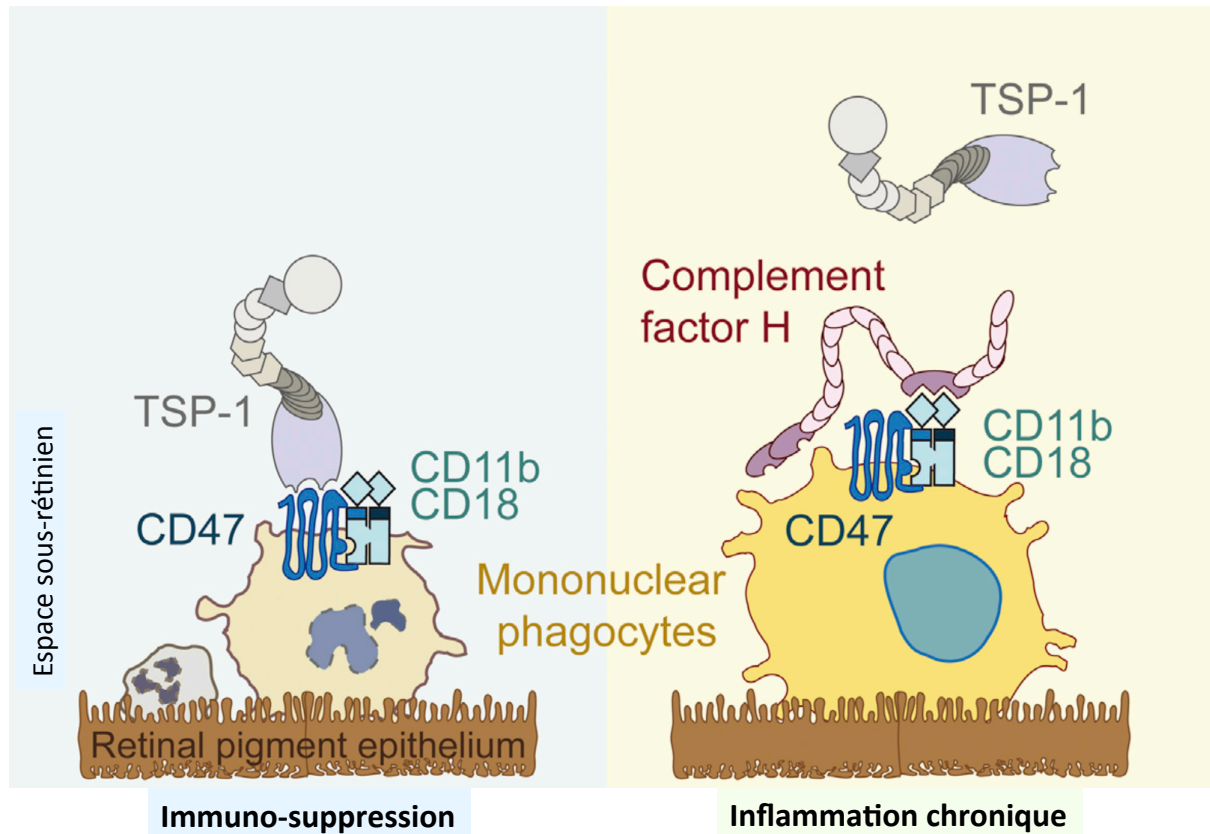


Figure 18 : Le facteur H du complément (CFH) inhibe la résolution de l'inflammation médiée par CD47.

(D'après Calippe et al, 2017, Immunity)

2.3.3) Patho-mécanismes induits par les cytokines inflammatoires

Comme nous l'avons vu précédemment, la progression de la DMLA chez l'homme est associée à l'accumulation sous-rétinienne de macrophages. Chez la souris, de nombreux modèles d'inflammation sous-rétinienne sont associés à l'accumulation de microglies activées, et de macrophages inflammatoires recrutés à partir de la population de monocytes classiques circulants exprimant de très faibles niveaux de CX3CR1. Ces populations cellulaires produisent des quantités importantes de cytokines inflammatoires, comme IL-1 β , IL-6 ou TNF- α .

2.3.3.1) IL-1 β

L'interleukine 1 bêta est une cytokine pro-inflammatoire qui joue un rôle central dans la médiation de la réponse inflammatoire à une infection ou une blessure (Dinarello, 1994). IL-1 β appartient à la famille des interleukines de type 1 : cette famille inclut 7 ligands agonistes dont IL-1 β , IL-1a, et IL-18, et 3 antagonistes dont IL-1Ra (Garlanda et

al., 2013).

L'IL-1 β est produite en quantité importante par les monocytes et les macrophages, en réponse à la stimulation des TLRs ou de récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRRs) par les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) et les motifs moléculaires associés aux signaux de danger (DAMPs), (Takeuchi and Akira, 2010). L'activation de ces récepteurs induit la production du précurseur de l'IL-1 β , la pro-IL-1 β . L'inflammasome - un complexe multi-protéique intervenant dans la maturation d'IL-1 β et IL-18 ou dans l'inactivation de l'IL-33 - prend alors en charge le processus de maturation de la pro-IL-1 β . L'échafaudage moléculaire de l'inflammasome comprend des molécules adaptatrices, des récepteurs - comme le NLRP3 - et la pro-caspase-1 (Schroder and Tschopp, 2010). L'activation de l'inflammasome induit l'activation de la caspase-1, qui à son tour clive la pro-IL-1 β (Thornberry et al., 1992), permettant la production d'IL-1 β mature qui est ensuite sécrétée (Brough and Rothwell, 2007).

L'IL-1 β est impliquée dans les mécanismes favorisant la progression de la DMLA exsudative en induisant la survie des cellules endothéliales et l'activation de gènes appartenant au répertoire génétique contrôlé par le VEGF (Schweighofer et al., 2009). L'inhibition d'IL-1 β prévient le développement de la néo-vascularisation choroïdienne (Lavalette et al., 2011), et la production d'IL-1 β active des mécanismes neurotoxiques associés à de nombreuses pathologies cérébrales (Simi et al., 2007; Yamasaki et al., 1995). Dans l'inflammation sous-rétinienne induite chez la souris déficiente en Cx3cr1, la dégénérescence des photorécepteurs est associée à la production accrue d'IL-1 β par les phagocytes mononucléés activés (Sennlaub et al., 2013). En effet, les macrophages déficients en Cx3cr1 sont insensibles au signal inhibiteur induit par la fractalkine, et libèrent une grande quantité d'ATP qui induit l'activation constitutive de leurs récepteurs P2RX7 - eux aussi surexprimés (Hu et al., 2015). La stimulation de ces récepteurs active à son tour l'inflammasome, ce qui augmente la sécrétion d'IL-1 β . Le lien mécanistique unissant la production d'IL-1 β à la dégénérescence des photorécepteurs est le sujet de cette thèse, et certaines hypothèses seront évoquées au chapitre « 3.2.1.3 La production d'IL-1 β induit indirectement la mort neuronale ».

2.3.3.2) TNF- α

La production de TNF- α est liée à la progression de la DMLA exsudative. Les patients dont les monocytes expriment de grandes quantités de TNF- α démontrent une plus haute prévalence de néo-vascularisation choroïdienne (Cousins et al., 2004) et l'inhibition du TNF- α réduit la formation des néo-vaisseaux induite par impact-laser (Shi et al., 2006). De plus, la concentration plasmatique en TNF- α augmente avec l'âge chez les patients (Bruunsgaard et al., 2000).

La production de TNF- α par des macrophages activés impacte l'homéostasie de l'EPR (Figure 19), en réprimant l'expression du facteur de transcription orthodenticle homeobox 2 (OTX2), ainsi que des gènes dont il contrôle l'expression, comme celui de la

rétinal déshydrogénase 5 (RDH5) (Mathis et al., 2017). OTX2 contrôle en effet des gènes cruciaux dans la régulation du cycle visuel du rétinale (Housset et al., 2013). Or, la DMLA précoce est associée à un temps de récupération plus important après éblouissement, ce qui suggère que le cycle visuel est ralenti, avant l'apparition de la dégénérescence rétinienne (Owsley et al., 2001). On peut donc penser que les phagocytes mononucléés qui s'accumulent au stade maculopathie à proximité des drusens pourraient induire un ralentissement du cycle visuel. Enfin, certaines données non publiées par notre équipe indiquent que l'exposition chronique de l'EPR au TNF- α suffit à induire de graves modifications morphologiques similaires à celles observées dans la DMLA (Touhami et al, 2018 : article soumis).

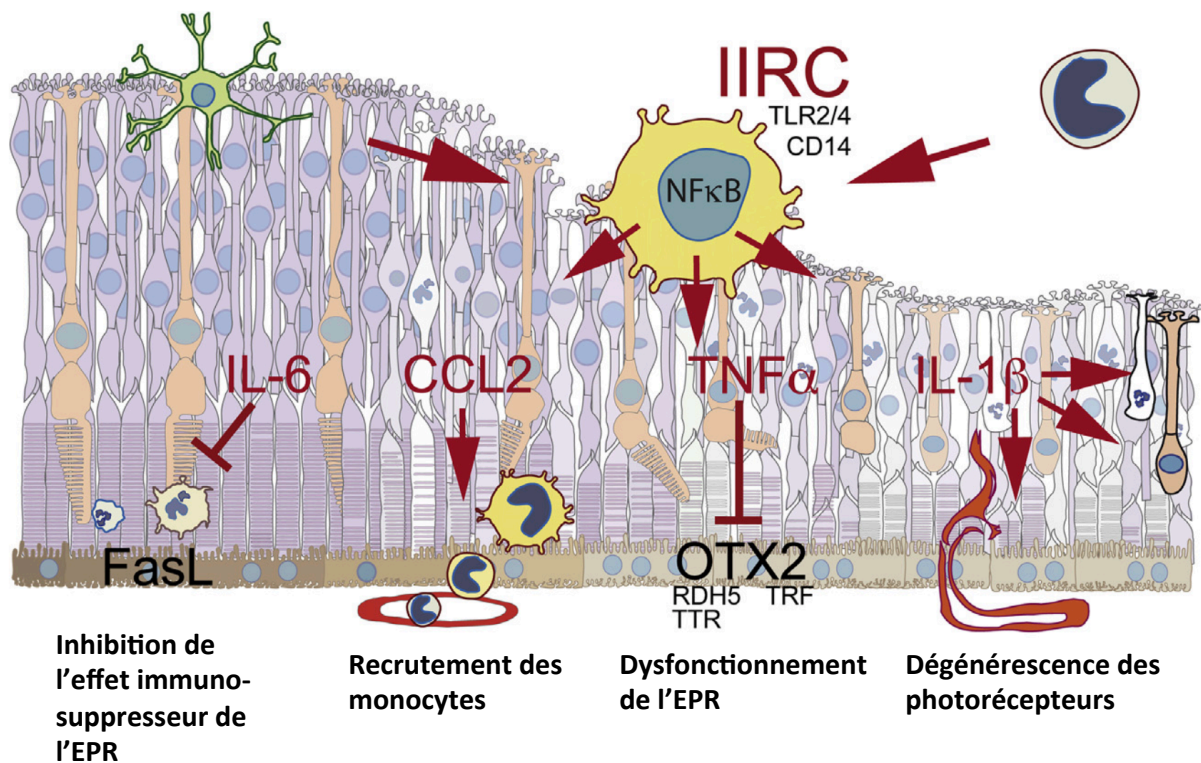


Figure 19 : La production de cytokines inflammatoires par les phagocytes mononucléés induit le dysfonctionnement et la dégénérescence de la rétine externe.

2.3.3.3) IL-6

Comme le TNF- α , la production d'IL-6 par les macrophages contribue à la néovascularisation choroïdienne (Izumi-Nagai et al., 2007; Levy et al., 2015a). De plus, les patients atteints par la DMLA exsudative présentent un pourcentage plus élevé de monocytes circulants exprimant IL-6 (Lechner et al., 2017). Mais l'IL-6 joue aussi un rôle essentiel sur le privilège immunitaire de l'œil : dans l'inflammation sous-rétinienne, IL-6

réduit l'expression de FasL (Figure 19), favorisant l'accumulation de phagocytes mononucléés sous-rétiens (Levy et al., 2015a). Les macrophages de souris déficientes en Cx3cr1 ou de souris TRE2 produisent des niveaux élevés d'IL-6, ce qui explique l'infiltration excessive de macrophages observées dans les modèles d'inflammation sous-rétinienne (Levy et al., 2015a, 2015b). Ces résultats suggèrent que l'inhibition d'IL-6 dans le cadre de la DMLA pourrait favoriser la résolution de l'inflammation en restaurant les fonctions du privilège immunitaire de l'espace sous-rétinien.

III) Neuro-immunité de la DMLA atrophique

Dans ce chapitre, nous développerons une vision globale des mécanismes reliant la production de cytokines – par les macrophages sous-rétiens – aux désordres physiologiques affectant (i) l'épithélium pigmentaire et (ii) la rétine neurale, et plus particulièrement les photorécepteurs, qui sont les deux populations cellulaires les plus affectées lors de l'atrophie géographique.

3.1) Dégénérescence de l'EPR

3.1.1) Généralités

Avec l'âge et l'exposition ininterrompue aux stress environnementaux, l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) présente de plus en plus de dysfonctionnements. Chez certains patients, l'EPR dégénère, et cette dégénérescence joue un rôle central dans la forme sèche de la DMLA, ou géographie atrophique. Tous les mécanismes qui impactent la survie de l'EPR ou l'ordre dans lequel ils surviennent n'ont pas été totalement élucidés, mais il apparaît nettement que le stress oxydant et l'inflammation jouent un rôle majeur dans cette dégénérescence. Identifier la nature des perturbations qui déstabilisent l'intégrité de l'EPR est essentiel pour comprendre l'enchaînement des patho-mécanismes conduisant à l'apparition de la forme clinique de la DMLA sèche. Dans cette partie, nous traiterons dans un premier temps les modifications histopathologiques de l'EPR induites par le stress oxydant, puis par les cytokines inflammatoires, et plus particulièrement l'IL-1 β .

3.1.2) Impact du stress oxydant sur l'EPR

Chez les patients qui présentent une DMLA précoce, les cellules de l'EPR présentent une forme atypique, élargie, et sont plus nombreuses à être multi-nucléées (Starnes et al., 2016). Ces caractéristiques pourraient être dues à des fusions cellulaires, ou un défaut lors de la division cellulaire – qui est réactivée dans le cadre de la dégénérescence. Or,

certaines études ont montré que la phagocytose des segments externes – riches en acides gras polyinsaturés - oxydés entraîne la production de stress oxydant, induisant une réplication incomplète des cellules de l'EPR (Ach et al., 2014; Chen et al., 2016) : ce mécanisme pourrait expliquer la présence accrue de cellules multi-nuclées chez les patients atteints de DMLA.

Effectivement, l'EPR est constamment soumis à un stress oxydatif important, dû à son environnement et à ses fonctions. C'est son activité métabolique, associée à la présence de nombreuses mitochondries fournissant l'énergie nécessaire au fonctionnement de l'EPR (Strauss, 2005), qui génère une quantité particulièrement élevée de radicaux libres et réactifs intermédiaires de l'oxygène (ROS). Pendant la phagocytose des segments externes par exemple, les phagosomes génèrent de l'eau oxygénée via l'activité des NADPH oxydases, de même que les peroxyosomes après bêta-oxydation des lipides provenant des photorécepteurs (Miceli et al., 1994; Tate et al., 1995). De plus, le stress photo-oxydatif causé par l'absorption de la lumière génère lui aussi une quantité extrêmement importante de ROS : ce type de stress a d'ailleurs été corrélé avec l'apparition de dommages occasionnés à la rétine et à l'EPR (Ham et al., 1978). De manière plus générale, on peut aussi relier l'étiologie de la DMLA à l'explosion de l'augmentation de la production de ROS, via la consommation de cigarettes par exemple. En conditions physiologiques, l'EPR a à sa disposition toute une batterie d'outils antioxydants qui devraient lui permettre de lutter contre les dommages oxydatifs. L'un des plus importants mécanismes mis en place est la cascade de signalisation contrôlée par le facteur de transcription Nrf2. Le Nrf2 régule un programme transcriptionnel qui permet de moduler l'homéostasie des systèmes redox, en protégeant ainsi les cellules de l'EPR (Nguyen et al., 2003). Malheureusement, il semblerait que ce système ne soit plus fonctionnel chez les patients atteints de DMLA. L'âge et la cigarette impactent négativement la production de l'ARNm et la protéine Nrf2, entravant tout le programme transcriptionnel qui se trouve en aval (Suzuki et al., 2008). Des études réalisées chez la souris âgée ont pu montrer l'inefficacité de la réponse Nrf2 après un challenge de stress oxydant (Sachdeva et al., 2014). Ces modèles sont néanmoins insuffisants pour induire chez le rongeur une dégénérescence de l'EPR comme on peut l'observer chez les patients, et tout porte à croire quand dans des stades avancés de DMLA, plusieurs mécanismes cyto-protecteurs sont probablement affectés.

3.1.3) Impact des cytokines inflammatoires, et notamment de l'IL-1 β

Comme nous avons pu le voir, la forme avancée de DMLA sèche est associée à une forte accumulation sous-rétinienne de macrophages pro-inflammatoires. Ces macrophages jouent un rôle pathogène, comme cela a été montré dans de nombreux modèles d'inflammation sous-rétinienne et de DMLA. Ces cellules produisent de grandes quantités de médiateurs pro-inflammatoires, comme l'IL-1 β , l'IL-6, le CCL2 ou le TNF- α .

Ces cytokines peuvent induire des effets toxiques au niveau de la rétine, comme nous le verrons dans le prochain chapitre, mais aussi sur les cellules de l'EPR.

En premier lieu, les macrophages sont recrutés au niveau des drusens, probablement pour participer à l'élimination des déchets lipidiques accumulés, et de débris cellulaires de l'EPR, asphyxié par l'accumulation de déchets. En théorie, l'effet immunosuppresseur de l'EPR devrait permettre l'élimination des phagocytes mononucléés afin d'éviter qu'ils s'accumulent. Dans un modèle de co-culture, les phagocytes mononucléés activés ont la capacité d'impacter le fonctionnement de l'EPR, en down-régulant l'expression d'OTX2 via la production de TNF- α - OTX2 étant un facteur de transcription qui régule des gènes essentiels à la fonction de l'EPR – favorisant ainsi leur survie au niveau de l'espace sous-rétinien (Mathis et al., 2017).

L'activation de l'inflammasome semble aussi être impliquée dans la pathogénèse de la DMLA sèche. L'inflammasome est un complexe mutli-protéique, qui réagit à différents signaux de danger, et permet la synthèse et la maturation d'IL-1 β et d'IL-18 (Martinon et al., 2002), ainsi que l'inactivation d'IL-33 (Cayrol and Girard, 2009). De nombreux facteurs peuvent activer l'inflammasome, comme le stress oxydant (Dostert et al., 2008) ou des composants de la cascade du complément. Plusieurs études montrent que la production d'IL-18 – qui découle de l'activation de l'inflammasome - est associée au développement de l'atrophie géographique (Tarallo et al., 2012) : IL-18 induit même l'apoptose des cellules de l'EPR, via l'activation de la caspase-8, soumise à un mécanisme dépendant de Fas ligand (Kim et al., 2014).

Sans aucun doute, l'activation du complexe de l'inflammasome a un objectif initial protecteur, comme la plupart des réactions inflammatoires. Le fait qu'il devienne pathologique dans le cadre de la DMLA peut être dû à plusieurs facteurs. (i) L'équilibre entre la production d'IL-1 β et d'IL-18 joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'inflammation. L'IL-18 est capable de limiter et contenir les effets pro-inflammatoires de l'IL-1 β : c'est par exemple le cas dans le cadre des infections gastriques, afin d'éviter d'endommager les cellules épithéliales (Hitzler et al., 2012). On peut imaginer qu'un déséquilibre dans la production de ces cytokines pourrait favoriser l'installation de l'inflammation de manière durable dans l'atrophie géographique. (ii) D'autre part, Doyle et al ont montré que l'augmentation de la production d'IL-18 due à l'activation de l'inflammasome permettait de prévenir la néo-vascularisation dans un modèle de DMLA aigue (Doyle et al., 2012), alors qu'à l'inverse, IL-18 semble contribuer à la mort des cellules de l'EPR dans un modèle chronique de géographie atrophique (Tarallo et al., 2012). Ces différences pourraient s'expliquer par la nature et la durée du stimulus initial, impactant finalement l'équilibre entre IL-1 β et IL-18. Ainsi, dans un certain contexte, la production d'IL-1 β perturberait cet équilibre, et favoriserait le développement d'un environnement pro-inflammatoire délétère.

3.2) Toxicité neuronale induite par les cytokines inflammatoires

La neuro-inflammation définit un ensemble de processus inflammatoires chroniques déclenchés par un stress initial – une blessure, une infection, une maladie auto-immune – et qui ne parvient pas à une résolution. Elle met en jeu différents facteurs de signalisation, qui agissent sur une grande variété de cellules différentes – glie, neurones, système immunitaire – qui participent à une réaction en chaîne qui, si elle n'est pas stoppée, aboutit à la mort neuronale.

Une vision relativement globale de ces mécanismes a émergé grâce aux travaux réalisés au cours de ces dernières années : on sait ainsi que la production de facteurs neurotrophiques et de chemokines est plutôt favorable à la survie neuronale (Seki et al., 2004), alors que les réactifs intermédiaires de l'oxygène (Annunziato et al., 2003) ou les cytokines (Holmin and Mathiesen, 2000) ont plutôt tendance à induire la mort neuronale par apoptose ou par nécrose.

Dans cette partie, nous verrons essentiellement comment le glutamate est étroitement impliqué dans ces mécanismes neurotoxiques, mais aussi comment le stress oxydant et la perturbation des communication intercellulaires contribuent au phénotype global impliqué dans les pathologies neuro-dégénératives, et dans quelle mesure ces conclusions peuvent être étendues ou appliquées à la DMLA atrophique.

3.2.1) Glutamate

3.2.1.1) Généralités sur le glutamate

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur prédominant dans la système nerveux central : il participe à la transmission du message nerveux tout au long de la chaîne de perception visuelle qui traverse la rétine. Les interneurons rétiniens (Cellules amacrines et horizontales) utilisent eux le plus souvent des messagers chimiques ayant un potentiel post-synaptique inhibiteur, du type glycine ou acide γ -aminobutyrique (GABA), afin de moduler l'intégration du signal nerveux par inhibition latérale.

Dans cette partie, nous nous focaliserons sur les particularités de l'homéostasie du glutamate au niveau de la rétine externe.

3.2.1.1.1) Le cycle du glutamate

Le glutamate est produit par les photorécepteurs pré-synaptiques à partir de glutamine : et est ensuite stocké au fur et à mesure dans des vésicules. Ce sont les VGLUTs – ou transporteurs vésiculaires du glutamate - qui permettent de faire transiter le glutamate du compartiment cellulaire à l'intérieur des vésicules synaptiques. A la suite d'un

potentiel d'action, leur contenu est libéré au niveau des terminaisons nerveuses directement dans la synapse.

3.2.1.1.1.1) Transporteurs du glutamate

Après fixation à ses récepteurs post-synaptiques, le glutamate est rapidement capturé par les cellules macrogliales via des transporteurs dédiés, afin d'éviter d'atteindre une concentration extracellulaire neurotoxique. Notons ici que les cellules gliales de Müller ne sont pas les seules à exprimer ces transporteurs : l'ensemble des cellules neuronales et gliales rétinienne expriment des transporteurs de haute-affinité au glutamate (Rauen and Wiessner, 2000). Ainsi, les cellules bipolaires, horizontales et les photorécepteurs expriment les transporteurs au glutamate EAAT2 (GLT-1), EAAT3 (EAAC1) et EAAT5. En résumé,

Il existe en fait deux catégories de transporteurs au glutamate : les canaux dont le fonctionnement dépend d'un gradient électrochimique de Na⁺ dits EAATs, et les autres. Les transporteurs vésiculaires VGLUTs – qui fonctionnent selon un gradient de protons et dont le rôle ne sera pas détaillé ici – les transporteurs électroneutres ASCT1 et ASCT2, ainsi que le système x_c⁻ - un échangeur glutamate/cystine - appartiennent à la deuxième catégorie.

3.2.1.1.1.1.1) EAATs

Structure : Les EAATs (Excitatory Amino Acid Transporter) sont des transporteurs électrogéniques secondaires dont la structure topologique comprend 8 domaines transmembranaires et deux épingles à cheveux β (Grunewald and Kanner, 2000).

Electrophysiologie : L'étude des conditions stoechiométriques de l'échange anionique réalisé par le transporteur EAAT a permis de déterminer que le passage d'une molécule de glutamate est possible grâce au co-transport de trois ions Na⁺ et un proton H⁺ en échange de la libération d'un ion K⁺ (Zerangue and Kavanaugh, 1996) (Figure 20). Il est intéressant de noter que les EAATs ont également une capacité de transport inversé (Watzke and Grewer, 2001) dans certaines conditions non-physiologiques - comme dans l'ischémie cérébrale -, et ainsi contribuer à l'établissement de conditions excitotoxiques (Rossi et al., 2000).

Membres : La famille des EAATs comprend aujourd'hui 5 membres : EAAT1 (Ou GLAST, le transporteur glutamate-aspartate), EAAT2 (Ou GLT-1), EAAT3 (Ou EAAC-1), EAAT4 et EAAT5. Ces protéines sont respectivement codées par les gènes *Slc1a3*, *Slc1a2*, *Slc1a1*, *Slc1a6*, et *Slc1a7*.

Localisation : Dans la rétine, l'expression de ces transporteurs a été identifiée par Eliasof et al (Eliasof et al., 1998) et l'expression d'EAAT5 semble à priori être exclusive à la rétine chez les vertébrés (Arriza et al., 1997). Alors que l'expression d'EAAT1 est restreinte à la cellule gliale de Müller (Lehre et al., 1997), on retrouve une répartition plus spécifique de l'expression des autres EAATs. EAAT2 est exprimé par les photorécepteurs, les cellules de Müller et les cellules bipolaires (Rauen and Kanner, 1994), EAAT3 par les neurones de la rétine interne (Schultz and Stell, 1996), EAAT4 par les astrocytes (Ward et al., 2004) et les segments externes des photorécepteurs (Pignataro et al., 2005), et EAAT5 par les photorécepteurs en bâtonnets, les bipolaires et les cellules de Müller (Arriza et al., 1997; Eliasof et al., 1998).

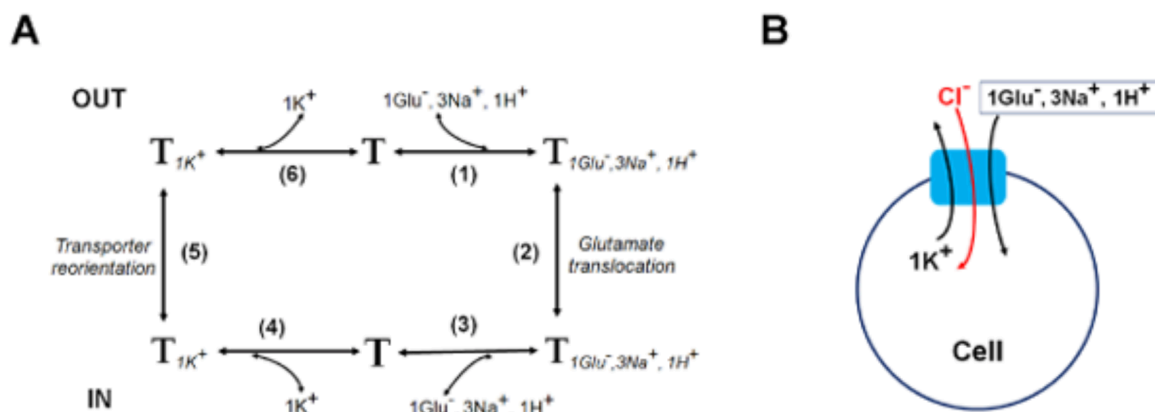


Figure 20 : Cycle de transport et stoechiométrie des EAATs. (A) Diagramme simplifié du cycle de transport des EAATs. Le glutamate se lie au transporteur (T), est transloqué, puis libéré dans le cytosol. Le K⁺ se lie alors du côté intracellulaire, réoriente le transporteur, et K⁺ est libéré en extracellulaire. (B) Schéma représentant la stoechiométrie des EAATs.

(D'après Jiang et al, 2011, Neuropharmacology)

Fonction : Que ce soit dans le cerveau ou la rétine, le rôle des EAATs est clairement établi: les transporteurs au glutamate permettant de capturer le glutamate extracellulaire libéré au niveau des synapses, assurant ainsi un contrôle précis de la transmission synaptique excitative.

Concernant la cellule de Müller : Dans la rétine, la cellule gliale de Müller est responsable de la plupart de la capture de glutamate extracellulaire. Là où 90% de la capture de glutamate dans le cerveau est assurée par le transporteur EAAT2/GLT-1 (Tanaka et al., 1997), c'est EAAT1/GLAST qui joue un rôle majeur au sein du tissu rétinien (Rauen, 2000). Chez la souris, la cellule de Müller assure 50% de la capture du glutamate par GLAST, 40% via des transporteurs électro-neutres Na⁺-dépendant, et 10% via d'autres transporteurs ou échangeurs Na⁺-indépendants (Sarthy et al., 2005). La présence d'autres membres de la famille EAAT au niveau de la cellule de Müller a aussi été relevée chez d'autres espèces (Rauen, 2000).

Malgré le rôle essentiel qu'ils jouent en conditions physiologiques, les EAATs ne sont définitivement pas les seuls transporteurs qui régulent l'homéostasie du glutamate, certains ayant un effet inverse. Le système x_c^- - un échangeur cystine/glutamate - a notamment été impliqué par de nombreuses études dans la mise en place de mécanismes neurotoxiques dévastateurs.

3.2.1.1.1.2) Le système x_c^-

Le système x_c^- est un co-transporteur de type anti-porteur présent à la membrane plasmique (Sato et al., 1995). Il fonctionne comme un transporteur électro-neutre, permettant le transport d'une molécule de cystine contre une molécule de glutamate, avec une stoechiométrie de 1:1, indépendamment du gradient de Na^+ (Sato et al., 1999). Ce système peut théoriquement fonctionner dans les deux sens (Bannai, 1986) : mais le pool intracellulaire de cystine étant restreint car elle est très rapidement réduite en cystéine, et la concentration extracellulaire en glutamate étant généralement plus élevée qu'en intracellulaire, le système x_c^- fonctionne quasi-systématiquement dans le sens où la cystine est importée via l'exportation de glutamate. Le système x_c^- est composé de deux sous-unités, une chaîne lourde 4F2hc qui lie le transporteur à la membrane plasmique (Bassi et al., 2001), et une chaîne légère xCT. C'est la chaîne légère (Figure 21 A), dont l'expression est codée par le gène *Slc7a11*, qui confère sa spécificité au transporteur x_c^- .

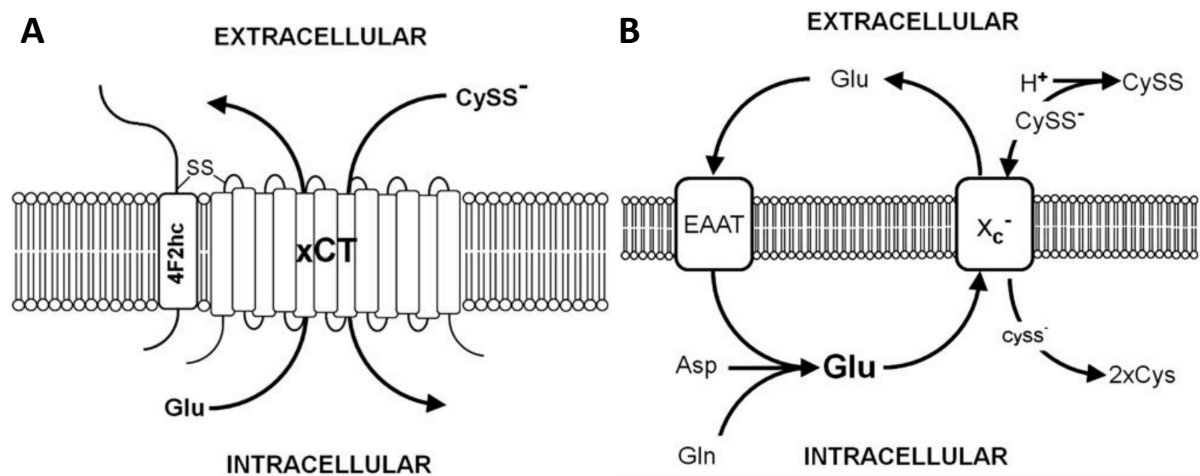


Figure 21 : Représentation schématique du système x_c^- . (A) Le système x_c^- est composé d'une chaîne lourde 4F2hc, et d'une chaîne légère xCT. (B) Le système x_c^- importe la cystine en échange du glutamate, recapté par les transporteurs EAATs.

(D'après Lewerenz et al, 2011, Antioxidants et Redox Signaling)

Le système x_c^- joue un rôle absolument vital dans la protection des cellules contre le stress oxydant : en effet, l'importation de cystine est nécessaire pour la production de glutathion (GSH) - un antioxydant majeur (Lewerenz et al., 2006a; Shih et al., 2006). En contrepartie, le relargage de glutamate - requis pour permettre la capture de cystine -

tend à accroître la concentration extracellulaire de glutamate, favorisant ainsi l'apparition de conditions excitotoxiques pour les neurones : c'est pourquoi l'expression et l'activité du système x_c^- doivent être très finement régulées. Il a été montré à plusieurs reprises qu'une activité/fonction aberrante de l'échangeur cystine/glutamate favorisait l'excitotoxicité dans le cadre de certaines pathologies neurodégénératives (Kigerl et al., 2012).

Système x_c^- et rétine : Chez la souris, l'ARNm xCT est exprimé au niveau de plusieurs organes, notamment – et de manière robuste – au sein des tissus qui composent le système nerveux central, le cerveau et la rétine (Burdo et al., 2006; Dun et al., 2006). Plus particulièrement, l'expression rétinienne du système x_c^- semble restreinte aux cellules gliales de Müller (Kato et al., 1993), aux macrophages résidents et aux photorécepteurs en cônes et en bâtonnets (Hu et al., 2008), où x_c^- participe à la libération synaptique non-vésiculaire de glutamate.

Le système x_c^- est actif dans la rétine. En effet, l'injection intravitréenne de DL- α -amino adipate – un inhibiteur du système x_c^- – entraîne une diminution de la concentration rétinienne en GSH (Glutathion), et induit un dysfonctionnement de la rétine (Kato et al., 1993). Ce résultat montre que le système x_c^- est fonctionnellement important pour la rétine.

Régulation transcriptionnelle : L'expression transcriptionnelle de xCT est notamment régulée par l'activation des AREs en réponse à Nrf2 (Sasaki et al., 2002). Sa surexpression est liée à une augmentation de l'activité du système x_c^- corrélée à un accroissement du taux intracellulaire de glutathion (Shih et al., 2003). En conditions physiologiques, Nrf2 est rapidement dégradé par le protéasome, car il interagit avec Keap1, une protéine adaptatrice Nrf2-spécifique reconnue par le complexe ubiquitine ligase Cul3 (Kobayashi et al., 2004; McMahon et al., 2003) : la transcription de gènes dont l'expression est contrôlée par Nrf2 est ainsi inhibée. Dans un contexte associé à une augmentation du stress oxydant, ou toute autre situation qui entraîne l'activation de la réponse cellulaire intégrée au stress (ISR), le facteur de transcription Nrf2 est transloqué au noyau. Là, en présence de petites protéines Maf, il se lie à des séquences régulatrices de type ARE, entraînant la surexpression des gènes qui y sont associés (Cullinan et al., 2003). Ces séquences ARE, appelées éléments de réponse antioxydant, sont des séquences régulatrices qui contrôlent l'expression des gènes antioxydants et cytoprotecteurs. Il est intéressant de noter que Nrf2 n'est pas le seul régulateur de xCT, et que l'activité d'ATF4 – un facteur de transcription dépendant du système ISR – est aussi liée à l'expression d'xCT (Sato et al., 2004), ainsi que d'autres protéines régulatrices dont l'activité est associée à un mécanisme protecteur contre certaines pathologies neuro-dégénératives.

Fonction physiologique : Dans des cellules matures en culture, les neurones présentent une faible activité du système x_c^- , alors que dans les astrocytes, le système x_c^- est très actif (Lobner, 2009). Les astrocytes sont capables de relarguer GSH et cystéine afin de

réguler l'état redox du tissu cérébral, grâce à leurs capacités antioxydantes (Dringen and Hirrlinger, 2003; Wang and Cynader, 2000). Shih et al ont montré que la surexpression de xCT dans les astrocytes permet d'augmenter la production de glutathion, et d'ainsi protéger les neurones contre le stress oxydant (Shih et al., 2006). Certes, le système x_c⁻ favorise la production de composés antioxydants via l'importation de cystine, mais la libération de glutamate qui se fait en contrepartie peut avoir un effet néfaste si elle est excessive. Dans certains modèles, l'augmentation de l'activité du système x_c⁻ est corrélée à une mort neuronale. Dans certains types de cancers comme le gliome, la mort neuronale est associée à une importante libération de glutamate via le système x_c⁻ (Chung et al., 2005); dans la maladie d'Alzheimer, ce sont les microglies qui, après avoir été exposées aux peptides A β , s'avèrent exercer un effet neurotoxique causé par la libération trop importante de glutamate (Qin et al., 2006).

En effet, l'activité du système x_c⁻ au niveau des microglies peut être toxique pour les cellules environnantes – et notamment les oligodendrocytes (Domercq et al., 2007). De même, des macrophages activés par le LPS sont en mesure de libérer assez de glutamate via le système x_c⁻ pour induire l'apoptose neuronale (Piani and Fontana, 1994). Dans le système rétinien, certaines données pointent aussi le rôle joué par les cellules gliales dans la neurotoxicité.

En conclusion, le rôle joué par le système x_c⁻ est celui d'une épée à double-tranchant, et peut avoir des effets bénéfiques ou négatifs. D'un côté, en cas de stress oxydant intense, l'augmentation de l'activité du système x_c⁻ permet d'augmenter la capture de cystine, et d'ainsi approvisionner la machinerie antioxydante. A l'inverse, si les cellules sont soumises à un stress excitotoxique, augmenter l'activité du système x_c⁻ et accroître la libération de glutamate pourrait avoir un effet destructeur.

3.2.1.1.1.2) Müller et photorécepteurs

Comme nous l'avons vu, les cellules gliales ont à leur disposition toute une batterie de transporteurs au glutamate, afin de permettre un nettoyage efficace de l'espace synaptique, et éviter une accumulation toxique du glutamate. Dans la rétine, les cellules gliales de Müller expriment fortement la glutamine synthétase, ou enzyme GS, qui permet l'amidation du glutamate, afin de le transformer en glutamine, molécule non-neurotoxique (Riepe and Norenburg, 1977). La glutamine est alors relarguée pour être ensuite captée par les neurones glutaminergiques pré-synaptiques, les photorécepteurs dans notre cas (Figure 22). Ces neurones pourront alors hydrolyser la glutamine grâce à l'enzyme glutaminase, produisant ainsi le glutamate, ce qui boucle le cycle neuro-glial glutamine/glutamate (Poitry et al., 2000).

3.2.1.1.2) Les récepteurs au glutamate

Le glutamate étant le neurotransmetteur exciteur majeur du système nerveux central chez les mammifères, les récepteurs au glutamate jouent un rôle absolument central dans la transmission synaptique. Il existe deux types de récepteurs au glutamate : (i) les récepteurs ionotropiques, qui permettent la transmission de l'influx nerveux, et (ii) les récepteurs métabotropiques, dont le rôle est de moduler la transmission synaptique et l'excitabilité neuronale.

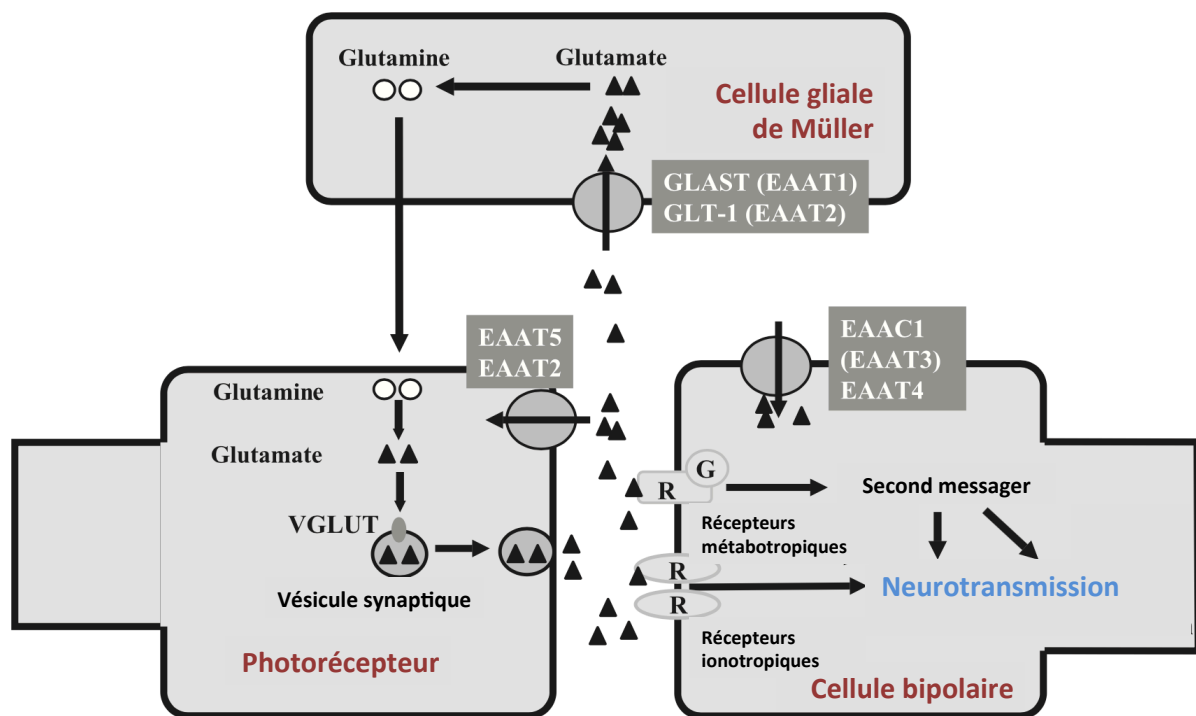


Figure 22 : Le cycle rétinien du glutamate - Régulations à l'échelle des photorécepteurs. Au niveau des photorécepteurs, le glutamate est chargé dans les vésicules synaptiques grâce aux transporteurs VGLUT. Lors de la transmission synaptique, le contenu de ces vésicules est libéré dans l'espace inter-synaptique : le glutamate se lie alors aux récepteurs exprimés par la cellule bipolaire, induisant la neurotransmission. L'excès extracellulaire de glutamate est recapté via les transporteurs EAATs, majoritairement par les transporteurs EAAT1 et EAAT2 exprimés par la cellule de Müller. Celle-ci métabolise alors le glutamate en glutamine, qui est renvoyée aux photorécepteurs, et à nouveau transformée en glutamate.

(D'après Shigeri et al, 2004, Brain Research Reviews)

3.2.1.1.2.1) Les récepteurs ionotropiques

Les récepteurs ionotropiques sont des récepteurs couplés à un canal ionique. Selon le type de récepteur, ce canal s'active et devient perméable aux ions Na⁺, K⁺, et parfois Ca²⁺ après liaison au glutamate. Deux catégories de récepteurs ionotropiques ont été identifiées à ce jour : les récepteurs NMDA, et les récepteurs non-NMDA – parmi lesquels on retrouve les récepteurs AMPA et kainate. Ces différents types de récepteurs sont nommés d'après leurs agonistes spécifiques.

Structurellement, les récepteurs ionotropiques sont composés de plusieurs sous-unités transmembranaires, qui s'assemblent de manière variable afin de former différentes isoformes.

Les récepteurs NMDA : Les récepteurs NMDA jouent un rôle crucial dans la communication neuronale. Ce sont des complexes d'hétéromères résultant de l'association de plusieurs sous-unités, donc il existe une grande diversité, ce qui résulte en une grande variété de NMDA-R (Paoletti et al., 2013). Chaque sous-unité confère des propriétés biophysiques et pharmacologiques uniques au récepteur. A plus large échelle, la composition des récepteurs NMDA peut avoir un impact allant de la plasticité synaptique aux mécanismes cellulaires impliqués dans les pathologies neuronales (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004), via notamment l'excitotoxicité due au glutamate – due à une grande perméabilité au Ca²⁺ (Liu et al., 2007).

Les récepteurs AMPA : Cette famille de récepteurs est majoritairement responsable de la transmission synaptique dite rapide (Raman et al., 1994). La plupart des récepteurs AMPA sont des assemblages hétéro-tétramériques composés à partir de quatre types de sous-unités GluA1-4 (Henley and Wilkinson, 2016). Cette composition aléatoire n'est pas anodine, car elle intervient dans la régulation du trafficking post-synaptique des AMPA-R, ce qui impacte la plasticité synaptique (Watson et al., 2017), ou la réponse neuronale au stress (Liu and Zukin, 2007). Les récepteurs AMPA sont perméables à différents types d'ions, comme Ca²⁺, Na⁺ et K⁺, permettant ainsi la conduction nerveuse. Il est très intéressant de noter que la perméabilité au Ca²⁺ pour ces canaux requiert l'absence de la sous-unité GluA2 sous sa forme éditée – une arginine remplaçant la glutamine en position 607 (Sommer et al., 1991) - : cela reste un événement assez rare malgré tout (Greger et al., 2002), ce qui fait du récepteur AMPA un candidat très probable pour la médiation de l'excitotoxicité (Chen et al., 1999; Vandenberghe et al., 2000).

Les récepteurs Kainate : Comme les récepteurs AMPA et NMDA, la famille des récepteurs kainate est composée de plusieurs combinaisons tétramériques réalisées à partir des différentes sous-unités GluK1-5 (Lerma and Marques, 2013), formant ainsi un canal perméable au Na⁺ et au K⁺ (Van Damme et al., 2002), ainsi qu'au Ca²⁺. Cette diversité est renforcée par l'épissage alternatif et l'édition d'ARNm (Köhler et al., 1993; Wilding et

al., 2005). La nature même du rôle des récepteurs kainate est encore assez controversée, mais ils interviennent à au moins trois niveaux : (i) la dépolarisation post-synaptique, (ii) la modulation de la libération pré-synaptique de neurotransmetteurs (Schmitz et al., 2000), et (iii) la maturation des circuits neuronaux pendant le développement (Lauri et al., 2006). Certaines études impliquent les récepteurs de type kainate dans le phénomène d'excitotoxicité induit par le glutamate (Milatovic et al., 2002).

La dimension pathologique et les mécanismes de l'excitotoxicité du glutamate causée par la sur-stimulation des différents récepteurs seront traités plus loin (1.2).

3.2.1.1.2.2) Les récepteurs métabotropiques

Les récepteurs métabotropiques au glutamate – couramment abrégés mGluRs – dont il existe huit isoformes, forment une super-famille de récepteurs synaptiques couplés aux protéines G, ou GPCRs : ce sont des récepteurs liés à la membrane plasmique. En réponse à une interaction avec leur ligand - le glutamate -, ils permettent la transduction de signaux intracellulaires via des interactions avec les protéines G. La nature de ces protéines G varie selon la sous-famille du mGluR concerné – groupe I, II ou III -, induisant ainsi différentes cascades intracellulaires de signalisation. Dans l'ensemble, les mGluRs du groupe I augmentent l'excitabilité neuronale, alors que ceux des groupes II et III ont tendance à inhiber la libération pré-synaptique de neurotransmetteurs – et seront donc exprimés par des neurones pré-synaptiques (Thompson et al., 1993). Nous ne détaillerons pas plus le rôle de ces récepteurs, qui restent rarement associés aux pathologies neuro-dégénératives liées au glutamate : on leur attribue d'ailleurs plus couramment un rôle protecteur (Baskys et al., 2005; Colwell and Levine, 1999), de par leur activité neuro-modulatrice.

3.2.1.1.2.3) Les photorécepteurs expriment les récepteurs au glutamate

La présence de récepteurs glutamatergiques ionotropiques au niveau de la membrane plasmique de neurones pré-synaptiques peut paraître contre-intuitive, en particulier au niveau des photorécepteurs, qui sont les neurones les plus en amont de la cascade visuelle.

Cependant, cette caractéristique est bien établie dans le cerveau, où la présence de d'auto-récepteurs glutamatergiques - de type kainate notamment – au niveau de neurones pré-synaptiques - dans l'Hippocampe - permet de réguler négativement la libération de glutamate, et d'ainsi moduler l'activité post-synaptique (Chittajallu et al., 1996). D'autres études menées à partir d'échantillons cérébelleux ont montré que l'acide kainique induisait la libération de glutamate à partir de certains neurones pré-synaptiques (Ferkany et al., 1982).

Et dans la rétine, ce phénomène n'est pas inconnu non plus. Une étude réalisée chez la souris a montré avec précision l'expression et la localisation pré-synaptique de la sous-unité GluK5 – appartenant au répertoire des récepteurs kainate - au niveau des terminaisons nerveuses des photorécepteurs en bâtonnets (Haumann et al., 2017). Chez la souris toujours, Jakobs et al ont montré l'expression des récepteurs kainate par les photorécepteurs en bâtonnets (Jakobs et al., 2007). Une autre étude a identifié l'expression des sous-unités GluR6 et GluR7 – appartenant aussi au répertoire des récepteurs kainate – au niveau pré-synaptique, c'est-à-dire au niveau des terminaisons des photorécepteurs en bâtonnets, chez le primate cette fois-ci (Harvey and Calkins, 2002). D'autres auteurs ont pu mettre en évidence en microscopie électronique chez le rat la présence de sous-unités des récepteurs NMDA au niveau terminal des dendrites synaptiques de photorécepteurs (Fletcher et al., 2000).

Enfin, plusieurs articles font état d'un effet excitotoxique du glutamate sur les photorécepteurs, ce qui pousse à croire que ceux-ci expriment bien des récepteurs glutamatergiques ionotropiques. Par exemple, à partir de cellules issues d'une lignée de rétinoblastome (Y-79) différenciées en photorécepteurs, une étude a montré l'effet excitotoxique du glutamate via des mécanismes impliquant le stress oxydant (Wang et al., 2016). Une autre étude, réalisée à partir de rétines d'embryons de poulet, a aussi montré un effet toxique du glutamate sur la survie des photorécepteurs, bien que modéré par rapport aux neurones des couches plus internes de la rétine (Reif-lehrer et al., 1975). Ces résultats ont été confirmés plus tard dans une autre étude, soulignant une fois de plus l'effet discret du glutamate sur les photorécepteurs par rapport aux autres neurones rétinien, ce qui pourrait expliquer pourquoi certains auteurs ont pu choisir d'omettre de mentionner cet effet (Blanks et al., 1981). Enfin, l'étude publiée par Delyfer et al établit clairement dans un modèle de rétinite pigmentaire – chez la souris *rd1* – que l'inhibiteur CNQX permet de protéger les bâtonnets de la dégénérescence dans un contexte où le glutamate extracellulaire s'accumule, suggérant ainsi l'existence d'un phénomène excitotoxique dirigé contre les photorécepteurs (Delyfer et al., 2005).

3.2.1.2) Toxicité du glutamate

Comme nous l'avons vu, le glutamate est un puissant neurotransmetteur excitateur qui permet en conditions physiologiques la transmission du message nerveux, mais qui dans certaines conditions pathologiques peut être toxique pour les neurones.

3.2.1.2.1) Excitotoxicité du glutamate

3.2.1.2.1.1) Définition

Lucas et al ont observé dès les années 50 qu'une concentration extracellulaire excessive en glutamate crée un phénomène excitotoxique chez les neurones, entraînant leur mort (Lucas and Newhouse, 1957; Olney, 1969). En règle générale, il était admis que l'excitotoxicité est due à une libération synaptique excessive de glutamate. Mais des études plus récentes ont mis en évidence la contribution d'autres populations cellulaires – comme les cellules gliales ou les macrophages - à l'accumulation extracellulaire de glutamate (Kigerl et al., 2012; Napper et al., 1999).

L'excitotoxicité en elle-même est causée par la sur-stimulation des récepteurs glutamatergiques. Ce phénomène induit de fortes modifications des concentrations ioniques intracellulaires, et s'accompagne d'un influx de Ca^{2+} , entraînant l'activation de mécanismes cellulaires létaux. On a longtemps cru que l'excitotoxicité due au glutamate – dans le cas des neurones corticaux par exemple - était essentiellement causée par l'activation des récepteurs NMDA (Choi, 1998; Choi et al., 1987). Jusqu'à ce que l'utilisation d'inhibiteurs de type NBQX/CNQX spécifiques des récepteurs AMPA/kainate prouve son utilité, comme dans un modèle de mort neuronale induite par LPS/cystine (Kigerl et al., 2012). Les récepteurs AMPA sont désormais aussi reconnus pour avoir un effet excitotoxique lorsqu'ils sont sur-stimulés (Kiagiadaki et al., 2010).

Il est important de noter que si la majorité des études portant sur l'excitotoxicité met en jeu les NMDA-R, c'est parce que jusqu'à récemment les AMPA-R étaient considérés comme imperméables au Ca^{2+} - et pas parce que les AMPA-R jouent un rôle mineur dans ce phénomène. Ce serait d'ailleurs plutôt l'inverse, puisque certaines études en lien avec l'ischémie cérébrale révèlent un meilleur effet neuro-protecteur pour les antagonistes aux AMPA-R.

Le mécanisme impliqué dans l'excitotoxicité induite par le glutamate semble être la production d'espèces réactives oxygénées et azotées induite par l'augmentation de la concentration en ions Ca^{2+} (Dugan et al., 1995; Schinder et al., 1996), ce qui sera détaillé dans le prochain paragraphe.

3.2.1.2.1.2) Les acteurs moléculaires

La sur-stimulation des récepteurs glutamatergiques s'accompagne d'un fort influx de Ca^{2+} , qui conduit à une surcharge intracellulaire. Cette surcharge va permettre l'activation d'une série d'enzymes Ca^{2+} -dépendantes, augmentant la production d'espèces réactives oxygénées et azotées, et activant la cascade de réactions conduisant à la mort cellulaire.

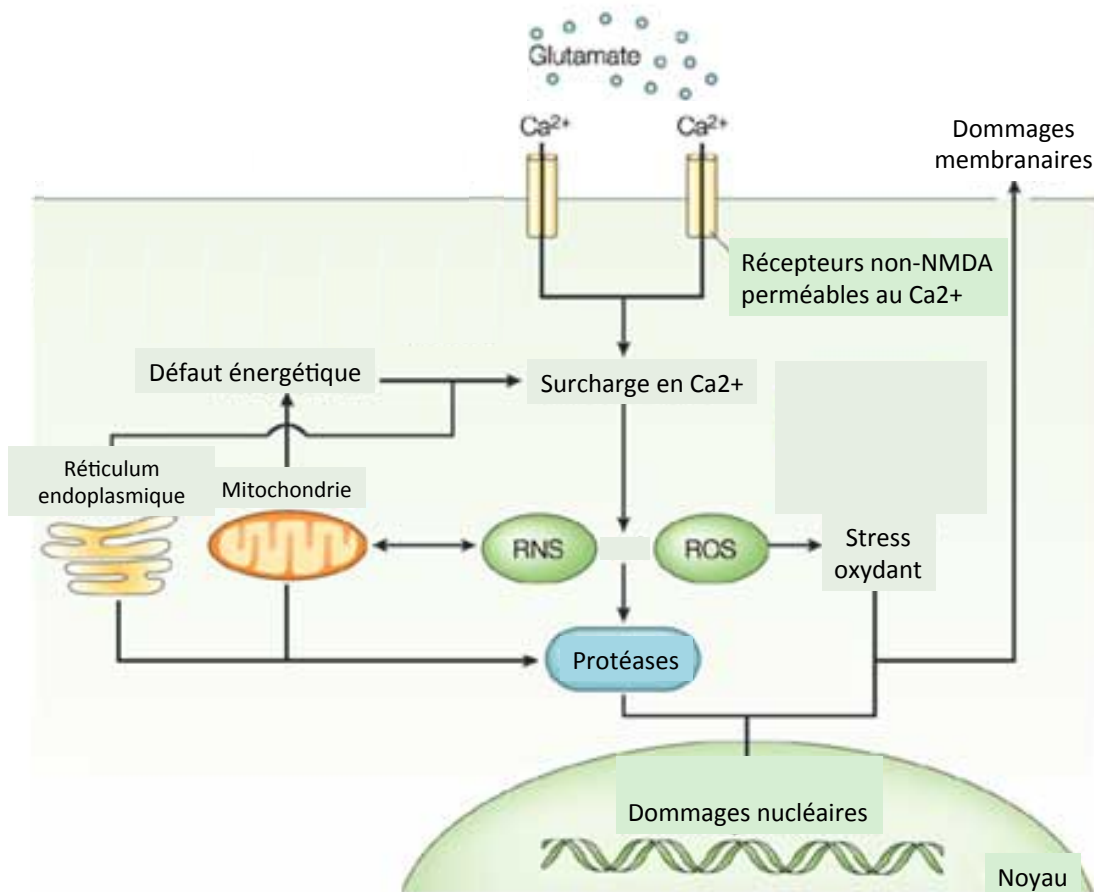


Figure 23 : Schéma représentant les principales voies de signalisation impliquées dans l'excitotoxicité.

(D'après Lo et al, 2003, Nature Review Neuroscience)

Dans le cas de l'excitotoxicité du glutamate, les deux événements clés sont l'influx de Ca²⁺, et l'effondrement du potentiel transmembranaire mitochondrial. Ainsi, l'excitotoxicité du glutamate est associée à une perturbation de l'homéostasie du Ca²⁺, induisant la production de ROS et de RNS, et la perte de fonction mitochondriale (Figure 23).

ROS : Les neurones, qui ont des compétences extrêmement limitées en matière de défense anti-oxydante, sont particulièrement vulnérables à la toxicité due aux radicaux libres ROS (Wang and Michaelis, 2010). En temps normal, les ROS contribuent à la signalisation cellulaire via différents mécanismes, comme la modulation de l'activité enzymatique, ou l'activation de facteurs de transcription (Dröge, 2002). Mais des taux élevés de ROS entraînent l'activation de processus pro-apoptotiques.

Chez les neurones, très gourmands en énergie, une mitochondrie dysfonctionnelle est une source importante de radicaux libres. Ainsi, un problème au niveau de la chaîne de respiration mitochondriale peut contribuer à la mort neuronale via apoptose ou

nécrose. Une autre source neuronale majeure de ROS est la NADPH oxidase, qui favorise la production de superoxyde (Brennan et al., 2009).

RNS : L'influx de Ca^{2+} a aussi pour propriété d'activer l'enzyme nNOS, favorisant la production du messenger gazeux NO (Bredt et al., 1991). L'oxyde nitrique joue un rôle important dans l'excitotoxicité, en interagissant avec l'anion superoxyde pour former la péroxynitrite, hautement toxique (Beckman et al., 1990), qui va ensuite interférer avec la respiration mitochondriale.

Réticulum endoplasmique : Certaines études suggèrent que la production de NO associée à une surcharge en Ca^{2+} entraînerait la libération du Ca^{2+} piégé dans le réticulum, induisant ainsi un stress (Uehara et al., 2006).

Protéases : Les mécanismes apoptotiques induits par l'excitotoxicité requièrent l'activation de protéases telles que les calpaïnes et les caspases. Les calpaïnes, en plus de moduler de nombreux processus physiologiques (Robles et al., 2003), peuvent aussi jouer le rôle de médiateurs dans la mort cellulaire, en activant des voies apoptotiques indépendantes des caspases (Neumar et al., 2003). Les caspases interviennent dans une cascade de mécanismes initiée par la libération du cytochrome c (Danial and Korsmeyer, 2004), et qui s'achève par l'activation de la caspase-3 (Eldadah and Faden, 2000), induisant l'apoptose neuronale.

Cette liste de mécanismes n'est pas exhaustive, mais donne une assez bonne vision de l'ensemble des processus impliqués dans l'apoptose neuronale suite à un événement excitotoxique.

3.2.1.2.1.3) Pathologies liées à l'excitotoxicité

Le rôle de l'excitotoxicité dans ces maladies neuro-dégénératives est aujourd'hui reconnu, et requiert d'autant plus d'attention qu'elles affectent un nombre croissant d'individus. La chorée de Huntington par exemple est un trouble neuro-dégénératif héréditaire qui détériore les fonctions cognitives, les fonctions motrices et l'humeur. Elle affecte sévèrement les projections GABAergiques des neurones épineux moyens situés dans le néostriatum (Vonsattel and DiFiglia, 1998). L'hypothèse excitotoxique a été retenue par certains chercheurs pour expliquer la sensibilité exacerbée des neurones du striatum dans le cadre de cette pathologie, en impliquant les récepteurs glutamatergiques ionotropiques (Coyle and Schwarcz, 1976; Zhang et al., 2008). Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer - un trouble neuro-dégénératif associé à une perte progressive de la mémoire et des fonctions cognitives - ce sont les dépôts de plaques $A\beta$ qui semblent induire les symptômes observés. Ces dépôts initieraient les cascades neurotoxiques entraînant l'excitotoxicité, l'inflammation et la mort neuronale (Selkoe and Hardy, 2016). Concernant la maladie de Parkinson - désordre neurologique causé

par la perte des neurones dopaminergiques – les causes de la maladie sont encore explorées. Le concept d'excitotoxicité serait aussi mis en cause par certaines études (Helton et al., 2008).

La rétine, qui appartient au système nerveux central, est elle aussi soumise au phénomène d'excitotoxicité dans le cadre de certaines pathologies oculaires, comme l'occlusion veineuse, le glaucome, ou la rétinopathie diabétique. Concernant l'ischémie – un ensemble de conditions pathologiques qui entraîne une diminution du flux sanguin, créant un défaut d'oxygène et de glucose - de nombreuses modifications morphologiques et fonctionnelles apparaissent au cours du temps. On constate une diminution de la capture de glutamate via les transporteurs EAATs (Barnett et al., 2001), qui s'accompagne d'une augmentation de la concentration extracellulaire en glutamate, comme cela a pu être mesuré dans l'humeur aqueuse (Wakabayashi et al., 2006). Cette perte de fonction pourrait être due à un ensemble de perturbations métaboliques aiguës (Bull and Barnett, 2002; Conradt and Stoffel, 1997).

Le glaucome caractérisé par une apoptose progressive et rapide des cellules ganglionnaires rétiniennes. Le métabolisme du glutamate est mis en cause dans cette maladie : certaines études rapportent une diminution de l'expression des EAATs dans des modèles de glaucome chez le rongeur (Schuettauf et al., 2007). De même, certains auteurs rapportent une série de perturbations métaboliques au sein de la cellule de Müller, avec typiquement une diminution de l'expression et de l'activité de la glutamine synthétase (Moreno et al., 2005). Enfin, l'article de Ju et al montre une association entre l'augmentation de la pression intra-oculaire et l'occurrence de dommages mitochondriaux dans un modèle murin (Ju et al., 2008).

Dans le cadre de la rétinopathie diabétique – une complication due au diabète – des niveaux élevés de glutamate et de stress oxydant entre autres semblent jouer un rôle essentiel dans la pathogénèse de cette maladie. Les mêmes mécanismes que précédemment semblent être impliqués, avec une petite particularité : alors que la fonction des transporteurs glutamatergiques est bien diminuée (Li and Puro, 2002), certaines études rapporteraient une augmentation de l'activité de la glutamine synthétase (Silva et al., 2013) – apparemment insuffisante pour composer efficacement l'accumulation de glutamate. Il est intéressant de noter que ce dernier article pourrait montrer - sans le nommer - un rôle joué par l'échangeur cystine/glutamate.

Du point de vue thérapeutique, et afin d'éviter une surcharge métabolique intracellulaire en Ca^{2+} due à l'excitotoxicité, il a été envisagé d'inhiber les récepteurs glutamatergiques à l'aide d'antagonistes spécifiques. Cependant, il est désormais évident que le blocage des récepteurs au glutamate interfère avec le fonctionnement du cerveau, et s'accompagne d'effets neurologiques délétères, comme montré dans plusieurs essais cliniques (Lees, 1998). Il paraît donc approprié d'envisager d'autres pistes thérapeutiques.

3.2.1.2.2) Oxytose et système x_c^-

3.2.1.2.2.1) Stress oxydant

Nous avons pu le voir précédemment, le stress oxydant joue un rôle majeur dans la pathogénèse de l'atrophie géographique, notamment vis-à-vis de l'EPR, mais aussi des neurones. On peut dissocier deux composantes du stress oxydatif : les espèces réactives d'une part, et la voie du monoxyde d'azote d'autre part.

L'ensemble des espèces oxydatives oxygénées et azotées forme un autre groupe de médiateurs potentiellement neurotoxiques. Les espèces réactives de l'oxygène sont plus communément appelées ROS, acronyme dérivé de leur appellation anglaise « reactive oxygen species ». Cette famille comprend plusieurs composés chimiques hautement instables qui participent en situation physiologique à certaines chaînes de signalisation (Nimnual et al., 2003). Parmi ces composés, on retrouve l'ion superoxyde, les radicaux hydroxyle, et le peroxyde d'hydrogène (Hensley et al., 2000). Les cellules possèdent un système de défense antioxydant efficace et des mécanismes de réparation adaptés, permettant de lutter efficacement contre les composés instables de l'oxygène (Hunter et al., 1985) mais qui peuvent être débordés dans un cadre inflammatoire.

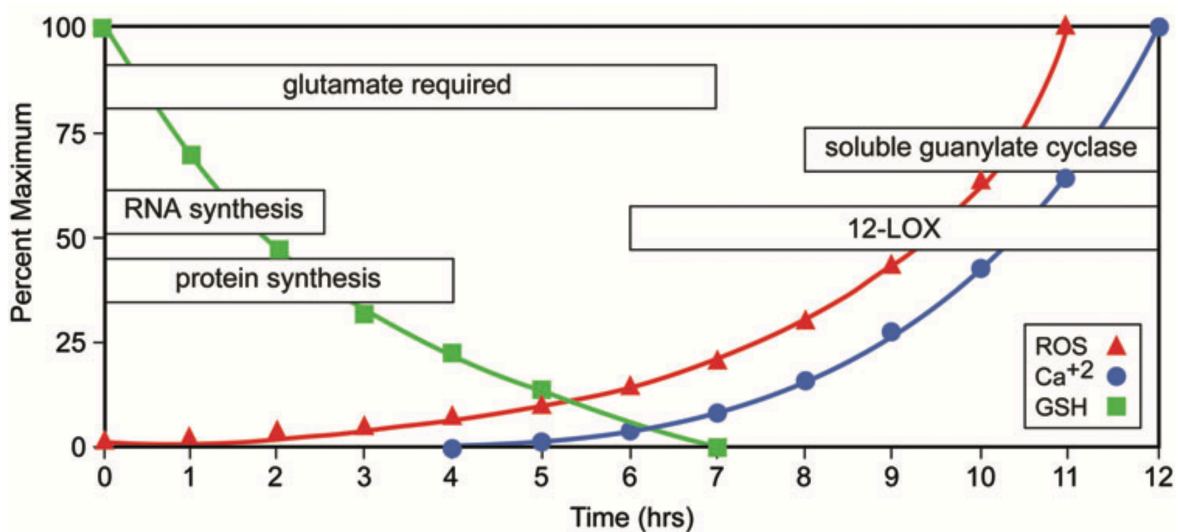


Figure 24 : Toxicité oxydative du glutamate, la mort neuronale induite par l'inhibition du système x_c^- .

(D'après Lewerenz et al, 2011, Antioxidants and Redox Signalling)

L'autre type de médiateur inflammatoire appartenant aux espèces réactives est le messenger gazeux NO, ou monoxyde d'azote, produit par l'enzyme nitric oxide synthase (NOS), dont il existe trois isoformes. La forme neuronale (nNOS) et la forme épithéliale (eNOS) sont constitutivement exprimées par les neurones et les cellules endothéliales respectivement : leur activité est régulée de manière Ca^{2+} -dépendante. La forme

inductible iNOS n'est pas, comme son nom l'indique, exprimée constitutivement : son expression est induite dans les macrophages, les microglies ou les astrocytes en réponse à un stimulus inflammatoire du type endotoxine (LPS) ou cytokine (Stuehr and Marletta, 1985). Le messenger gazeux NO est capable d'induire l'apoptose neuronale, et plus particulièrement lorsque les neurones sont privés de facteurs neurotrophiques (Estevez et al., 1998). Certaines études suggèrent que NO exerce un effet néfaste sur la survie des neurones en inhibant la respiration mitochondriale, conduisant à une défaillance énergétique, puis à une augmentation des concentrations intracellulaires en Na^+ et en Ca^{2+} , induisant finalement la mort neuronale (Kapoor et al., 2003).

3.2.1.2.2.2) Métabolisme du glutathion

Comme nous l'avons vu précédemment, le glutathion est un petit tripeptide GSH, et est l'un des antioxydants biologiques les plus puissants à disposition des cellules. Le glutathion joue le rôle d'agent réducteur pour une grande variété de composés chimiques : disulfides, peroxydes, composés nucléophiles, permettant ainsi d'éliminer les réactifs oxydants comme le peroxyde d'hydrogène ou les radicaux libres.

La première étape dans la synthèse de GSH est la génération de γ -glutamylcystéine, catalysée par la glutamate cystéine ligase (GCL) (Misra and Griffith, 1998). La GSH synthétase catalyse ensuite la synthèse de glutathion à partir de γ -glutamylcystéine et de glycine. Le glutathion peut ensuite être transporté en dehors de la cellule, et va permettre de réduire différents types de ROS via des réactions catalysées par la glutathion peroxydase GPx. Durant cette réaction, le GSH est oxydé en GSSG, puis est recyclé par la GSH réductase, ou est ensuite exporté de la cellule.

3.2.1.2.2.3) Oxytose

Le transport de glutamate via le système x_c^- dépend en grande partie du gradient transmembranaire de glutamate. Il peut donc être inhibé par le glutamate extracellulaire, seul antagoniste physiologique connu à ce jour.

En théorie, les transporteurs EAATs ont la capacité fonctionnelle de réduire la concentration extracellulaire de glutamate à 2 nM (Zerangue and Kavanaugh, 1996). Cependant, même si dans le cerveau la majorité du glutamate se trouve en intracellulaire, la concentration extracellulaire mesurée par microdialyse est d'environ 2-9 μM (Baker et al., 2003). Cette différence résulte de l'export extrasynaptique de glutamate dû à l'activité du système x_c^- . Le système x_c^- est le médiateur de la capture de cystine. La cystine une fois capturée est rapidement réduite en cystéine, la facteur limitant régulant la production du glutathion (Cooper and Kristal, 1997).

En 1989, Murphy et al ont montré que le glutamate induisait la mort cellulaire de manière Ca^{2+} -dépendante, en inhibant la capture de cystine et induisant ainsi une déplétion en GSH, et une augmentation du stress oxydant (Murphy et al., 1989a). L'inhibition de l'import de cystine via le système x_c^- entraîne donc une augmentation du stress oxydant, et éventuellement la mort cellulaire. Ce mécanisme est appelé « toxicité oxydative du glutamate », ou oxytose – oxytosis en anglais. Il est important de noter que le phénomène d'oxytose est fonctionnellement différent de l'excitotoxicité à proprement parler.

Mécanisme : La série d'évènements qui conduit à la mort cellulaire par oxytose a été assez bien caractérisée. Comme nous l'avons vu, de fortes concentrations extracellulaires en glutamate inhibent le fonctionnement du système x_c^- , induisant un défaut de la capture en cystine, ralentissant la synthèse de GSH, jusqu'à sa disparition (Lewerenz et al., 2006b). Environ 6 heures après le traitement au glutamate, la concentration en GSH chute en dessous de 20%, et les radicaux libres produits par l'activité mitochondriale du complexe I s'accumulent exponentiellement (Tan et al., 1998a). L'importance du rôle de la mitochondrie dans la production de ROS (Neitemeier et al., 2016) est soutenue par le fait l'agent découplant du carbonyl cyanide 4-(trifluorométhoxy) phénylhydrazone – plus couramment appelé FCCP - permet une protection relativement efficace des neurone contre l'oxytose (Tan et al., 1998a). L'enzyme 12/15-lipoxygénase entre alors en jeu, probablement suite à l'inhibition de la GSH peroxydase 4 (GPx4) (Seiler et al., 2008), générant les acides 12- et 15-hydroxyeicosatétranoïques (Li et al., 1997a). Ces facteurs activent les guanylates cyclases, qui induisent une augmentation de la concentration intracellulaire en cGMP, et un fort influx de Ca^{2+} s'en suit (Li et al., 1997b). 10 à 12h après l'induction de l'oxytose, la concentration en ROS est maximale, et induit l'apoptose (Landshamer et al., 2008) (Figure 24).

Différences avec l'apoptose classique : La nomenclature actuelle différencie trois types de morts cellulaires : l'apoptose classique ou type I, l'autophagie ou type II, et la nécrose programmée ou type III. L'oxytose partage des caractéristiques avec le type I et le type III (Higgins et al., 2009). Certains résultats suggèrent que dans le cas de l'oxytose, l'apoptose et la nécrose auraient lieu en même temps (Fukui et al., 2009). Globalement, l'oxytose présente quelques particularités, comme l'absence de libération du cytochrome c, et une fragmentation tardive de l'ADN (Tan et al., 1998b).

Le phénomène d'oxytose a pu être étudié et observé à partir de neurones en culture : en effet, dans des culture primaires de neurones immatures, les récepteurs au glutamate ne sont pas exprimés, ce qui prévient l'effet excitotoxique du glutamate extracellulaire en forte concentration. En revanche, il est très intéressant de noter que dans des cultures primaires de neurones maintenus assez longtemps pour que les récepteurs ionotropiques soient exprimés, les cellules sont sensibles à l'excitotoxicité, mais

succombent aussi à l'oxytose induite par le glutamate : les deux phénomènes ne sont donc pas incompatibles (Schubert and Piasecki, 2001).

L'échangeur cystine/glutamate est un outil complexe à manipuler par nature, de par ses effets ambivalents. La surexpression du système x_c^- permet la capture de cystine et la production d'antioxydants, mais occasionne parallèlement une libération excessive de glutamate qui peut être toxique pour les neurones environnants. Le fait que des cellules neuronales immatures en culture incubées avec de hauts niveaux de glutamate meurent à cause du stress oxydant (Murphy et al., 1989a) montre bien qu'en situation pathologique, un déséquilibre entre la libération de glutamate via le système x_c^- et sa recapture par les EAATs pourrait conditionner l'augmentation de la concentration de glutamate extracellulaire jusqu'à des niveaux toxiques.

Ce point mérite une attention particulière dans un contexte pathologique associé à une expression inadéquate des transporteurs au glutamate EAATs, censés théoriquement contrebalancer la libération de glutamate par le système x_c^- . Ce type de déséquilibre a été mis en évidence dans le contexte du gliome (Savaskan et al., 2008), où la surexpression de x_c^- favorise la survie des cellules cancéreuses (Takano et al., 2001) qui produisent une importante quantité de radicaux libres, conséquence logique de leur reconversion métabolique – on parle d'effet Warburg. La libération de glutamate entraîne la neuro-dégénérescence des tissus environnants, favorisant l'apparition de déficits neurologiques chez les patients : heureusement, ces effets morbides peuvent être atténués grâce à l'inhibition du système x_c^- (Savaskan et al., 2008).

3.2.1.3) La production d'IL-1 β induit indirectement la mort neuronale

De précédents rapports font état d'une potentialisation *in vitro* par IL-1 β et IL-6 de l'effet excitotoxique du glutamate sur les neurones (Qiu et al., 1998). L'IL-1 β peut être toxique pour les neurones du cerveau (Holmin and Mathiesen, 2000). En effet, l'IL-1 β est mise en cause dans l'apoptose neuronale déclenchée par l'ischémie cérébrale. Plus particulièrement, l'IL-1 β n'aurait pas d'effet toxique direct sur les neurones : ce sont les cellules gliales qui seraient les médiatrices de cette toxicité. Ce type d'interactions a particulièrement été mis en évidence via les études conduites sur le système x_c^- .

A partir de l'observation que les souris déficientes en IL-1R1 – le récepteur à l'IL-1 β – présentaient moins de pertes neuronales dans un modèle d'ischémie cérébrale, l'équipe de Sandra Hewett a montré le rôle central joué par IL-1 β dans la potentialisation de l'apoptose neuronale, via une sur-activation du système x_c^- des cellules astrocytaires (Fogal et al., 2007). IL-1 β régule l'expression et l'activité du système x_c^- dans les astrocytes en culture. Bien que x_c^- soit aussi exprimé par les neurones et les microglies, il apparaît qu'IL-1 β n'induit de modifications de son expression que dans les cellules gliales, induisant ainsi une libération excessive de glutamate, qui serait le médiateur de la toxicité neuronale causée par IL-1 β dans des conditions hypoxiques (Jackman et al., 2010a). De plus, exposer des co-cultures de neurones/astrocytes en conditions

hypoglycémiques a une dose d'IL-1 β permet aussi de potentialiser la mort neuronale (Jackman et al., 2012a).

Ce type de régulation induite par l'IL-1 β peut paraître contre-intuitive, puisqu'elle entraîne la mort neuronale. Mais il est intéressant de noter que la surexpression du système x_c⁻ permet malgré tout de favoriser la survie des astrocytes (He et al., 2015) : ainsi, nous serions une fois encore face à un mécanisme théoriquement bénéfique, mais qui peut s'avérer toxique en conditions pathologiques extrêmes – comme l'hypoxie ou l'hypoglycémie. Typiquement, dans la mesure où IL-1 β peut induire une baisse de la capture gliale de glutamate en conditions hypoxiques (Chen et al., 2014), on peut tout à fait imaginer une configuration favorisant la survie des cellules gliales, mais impactant négativement celle des neurones. De manière globale, il a d'ailleurs été montré plusieurs fois que la clairance du glutamate est inhibée en présence de médiateurs pro-inflammatoires, comme le TNF- α ou l'IL-1 β (Chao et al., 1995; Fine et al., 1996; Takahashi et al., 2003).

Enfin, un article, publié en 2016 par Shi et al, a mis en évidence un mécanisme déclenché par l'IL-1 β , impactant l'expression du système x_c⁻. Les auteurs ont montré que l'IL-1 β induit une surexpression de l'ARNm codant la sous-unité xCT du système x_c⁻ dans des astrocytes en culture. Le mécanisme mis en évidence fait intervenir l'élément trans-régulateur HuR, qui en présence d'IL-1 β est transloqué du noyau au cytoplasme, se lie à l'extrémité 3'-UTR de xCT, et en stabilise l'ARNm, permettant ainsi d'augmenter sa demi-vie. Cet effet est accompagné par l'augmentation de la synthèse protéique et l'activité du système x_c⁻ (Shi et al., 2016).

L'IL-1 β est donc connue pour jouer le rôle d'un médiateur toxique dans le contexte de l'ischémie cérébrale, mais étrangement, certaines études lui confèrent un rôle neuroprotecteur dans la rétine en atténuant l'effet neurotoxique du glutamate (Namekata et al., 2009), ou en prévenant la dégénérescence des photorécepteurs induite par la lumière (LaVail et al., 1992; Whiteley et al., 2001). Cependant, les auteurs de ces études ont réalisé chez les animaux étudiés l'injection intra-vitréenne d'une dose d'IL-1 β équivalente à une dizaine de microgrammes par œil. On sait que les dosages protéiques effectués par ELISA permettent de doser l'IL-1 β à une cinquantaine de picogrammes par œil dans des modèles d'inflammation sous-rétinienne (Lavalette et al., 2011). On peut donc penser à un effet dose-réponse d'IL-1 β , qui serait neuroprotecteur à forte concentration, et neurotoxique à doses plus physiologiques.

Dans l'ensemble, IL-1 β favorise les dommages neuronaux via un mécanisme glutamate-dépendant, dans un contexte où l'énergie fait défaut – c'est-à-dire avec un défaut de glucose ou d'oxygène (Fogal et al., 2007; Jackman et al., 2010b, 2012a). IL-1 β est aussi capable de protéger les astrocytes contre le stress oxydant, en augmentant la biosynthèse de GSH (He et al., 2015). Ces résultats montrent que la capacité de l'IL-1 β à avoir un effet bénéfique ou néfaste est très contexte-dépendant.

3.2.2) Les communications cellulaires rétiniennes

Comme nous l'avons vu, on retrouve trois types de cellules gliales dans la rétine des mammifères : les astrocytes, les cellules gliales de Müller, et les microglies. Ces cellules gliales fournissent un support structurel et métabolique, en phagocytant les débris neuronaux, en produisant des neurotransmetteurs ou des facteurs trophiques, et en régulant les équilibres aqueux et ionique. Les astrocytes, majoritairement localisés dans la couche la plus interne de la rétine, participent à la formation de la barrière hémato-rétinienne en étendant leurs prolongements cytoplasmiques autour des vaisseaux. Les microglies peuvent être stimulées et remplir la fonction de macrophages, mais interagissent aussi bien avec les neurones environnants via la production de facteurs de croissance.

Il serait ambitieux de retranscrire ici l'ensemble des interactions neuro-gliales qui ont lieu au sein de la rétine, c'est pourquoi nous nous focaliserons sur celles qui impactent la survie neuronale, et plus particulièrement les photorécepteurs lorsque cela a été étudié.

3.2.2.1) Interactions neuro-gliales rétiniennes

3.2.2.1.1) Homéostasie du glutamate

Dans la rétine, les cellules de Müller sont responsables de la capture de l'excès de glutamate libéré au niveau des synapses lors de la neuro-transmission. Cette fonction est absolument essentielle au maintien de l'homéostasie rétinienne, et toute perturbation peut impacter la survie des différentes populations neuronales rétiniennes, ce qui peut être considéré comme une forme d'interaction neuro-gliale. Ces mécanismes de régulation ont été présentés au chapitre « 3.2.1.1.1) Le cycle du glutamate ».

3.2.2.1.2) Les facteurs trophiques

Les facteurs neurotrophiques sont des facteurs de croissance qui favorisent le développement et la survie neuronale. L'utilité de ces facteurs a été étudiée dans de nombreuses pathologies neuro-dégénératives – comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, ou le glaucome – afin de promouvoir la survie neuronale (Allen et al., 2013; Johnson et al., 2011).

Le BDNF (Ou Brain-Derived Neurotrophic Factor) appartient à la famille des neurotrophines, est exprimé par les neurones et promeut la survie neuronale (Barde et al., 1982). BDNF se lie à son récepteur TrkB, et induit l'expression de gènes associés à la survie neuronale, tout en inactivant les gènes pro-apoptotiques (Bonni et al., 1999). Il est intéressant de noter que TrkB est exprimé dans les cellules de Müller, mais n'a pas été détecté au niveau des photorécepteurs (Grishanin et al., 2008). Le traitement des

cellules de Müller avec BDNF entraîne en effet l'expression de FGF-2 et CNTF, induisant des effets neuroprotecteurs dans les photorécepteurs (Harada et al., 2015). FGF-2 permet par exemple de directement stimuler la survie des photorécepteur (Fontaine et al., 1998).

Le CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) exerce en effet un effet neuro-protecteur sur les neurones : la délétion du gène codant pour CNTF induit la dégénérescence neuronale dans des modèles murins (Linker et al., 2002). CNTF est majoritairement exprimé par la cellule gliale de Müller dans la rétine (Kirsch et al., 1997). CNTF a montré son efficacité dans la prévention de l'apoptose des photorécepteurs induite dans plusieurs modèles de dégénérescence rétinienne, y compris la rétinite pigmentaire (Cayouette et al., 1998; Tao et al., 2002).

Le GDNF (Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor) appartient à la superfamille de TGF- β . Dans la rétine, GDNF stimule la survie des photorécepteurs dans la dégénérescence rétinienne (Frasson et al., 1999). GDNF est majoritairement exprimé par les photorécepteurs ou l'EPR, et son récepteur est essentiellement exprimé au niveau de la cellule de Müller (Hauck et al., 2006). La culture de cellules de Müller isolée en présence de GDNF induit l'expression de BDNF (Harada et al., 2003), suggérant que GDNF exerce ses effets neuro-protecteurs vis-à-vis des photorécepteurs de manière indirecte, en stimulant les cellules de Müller. De plus, GDNF entraîne la surexpression du transporteur au glutamate EAAT1/GLAST dans les cellules de Müller (Koeberle and Bähr, 2008), suggérant que son utilisation serait une perspective intéressante pour maintenir le glutamate à des concentrations non-neurotoxiques (Harada et al., 1998).

Le NGF (Ou Nerve Growth Factor) appartient à la famille de neurotrophines, et peut stimuler les récepteurs TrkA et p75^{NTR}. La stimulation de ces récepteurs induit des effets opposés : celle de TrkA est associée à l'induction d'effets neuro-protecteurs, alors que celle de p75^{NTR} est impliquée dans l'apoptose neuronale (Frade et al., 1996; Nykjaer et al., 2004). L'utilisation d'antagonistes du récepteur p75^{NTR} permet d'ailleurs d'atténuer la dégénérescence des photorécepteurs dans des modèles de rétinite pigmentaire (Platón-Corchado et al., 2017).

Ces résultats montrent l'importance des interactions neuro-gliales entre les cellules de Müller et les photorécepteurs dans l'induction de la survie neuronale. La stimulation de la neuroprotection via ces mécanismes pourrait ainsi permettre de ralentir la dégénérescence neuronale observée dans l'atrophie géographique.

3.2.2.2) Interactions entre microglies et cellules de Müller

Les mécanismes qui régulent les interactions entre les microglies et les cellules de Müller n'ont pas été exhaustivement élucidés, mais il semble qu'il existe un dialogue entre ces deux populations cellulaires. Certaines données suggèrent que la disponibilité extracellulaire en ATP pourrait moduler la morphologie et l'activité des cellules microgliales (Li et al., 2012). Les cellules de Müller sont une source majeure d'ATP, et pourraient donc être impliquées dans ce mécanisme. Ainsi, le glutamate extracellulaire peut induire la libération d'ATP par les cellules de Müller via l'ouverture de canaux

pannexines (Iglesias et al., 2009), et il a été montré que l'inhibition des canaux pannexines entraîne une diminution de la mobilité des prolongements cytoplasmiques des microglies (Fontainhas et al., 2011). L'altération du métabolisme de la cellule de Müller pourrait donc affecter le fonctionnement des microglies. De même, les cellules de Müller semblent répondre à l'activation des microglies induite par le LPS, notamment en down-régulant l'expression de leurs transporteurs au glutamate, et en augmentant l'expression de gènes pro-inflammatoires (Wang et al., 2011). Il a de plus été montré que les microglies pouvaient libérer des quantités importantes de glutamate, induisant la diminution du transport de glutamate dans les astrocytes, et contribuant ainsi à l'accumulation plus importante du glutamate extracellulaire (Takaki et al., 2012). Il est intéressant de noter que dans certains modèles, les interactions microglie-cellules de Müller impactent la production de facteurs neurotrophiques, ce qui pourrait moduler la survie neuronale (Harada et al., 2002). Certaines de ces expériences ont été réalisées *in vitro*, il est donc risqué d'étendre leurs conclusions au fonctionnement d'une rétine entière, mais il est intéressant de noter que la signalisation mutuelle entre microglies et cellules de Müller pourrait amplifier les signaux inflammatoires.

OBJECTIFS

La dégénérescence maculaire liée à l'âge, ou DMLA, est la première cause de cécité chez les seniors dans les pays industrialisés (Klein et al., 2004). C'est une pathologie multifactorielle associée à l'âge qui résulte de l'interaction entre des facteurs de risques génétiques et environnementaux, (Yu et al., 2012). La DMLA affecte particulièrement la macula, zone de vision précise riche en cônes située au centre de la rétine. Dans un premier temps, la DMLA au stade précoce asymptomatique - dit « maculopathie liée à l'âge » - est caractérisée par la présence de dépôts lipoprotéiques de type « drusens » au niveau de la macula, et des anomalies pigmentaire de l'épithélium pigmentaire rétinien sous-jacent (Bird et al., 1995). Chez certains patients, ce stade précoce peut évoluer vers un état plus avancé (Klein et al., 2004) dont il existe deux formes cliniques : la DMLA exsudative - ou forme humide - et la géographie atrophique - ou forme sèche (Sarks, 1976). La forme humide est caractérisée par la néo-vascularisation sous-rétinienne qui se développe à partir de la choroïde, et s'accompagne de fuites vasculaires (Sarks, 1976). Dans la forme sèche, une lésion atrophique définie par la perte de l'épithélium pigmentaire (EPR) et la dégénérescence des photorécepteurs (Sarks, 1976) se développe progressivement au niveau de la macula (Sarks et al., 1988). A l'heure actuelle, des injections régulières d'anti-VEGF permettent de ralentir la progression de la DMLA exsudative chez 90% des patients (Rofagha et al., 2013), mais il n'existe encore aucun traitement pour l'atrophie géographique.

A l'état normal, la couche des photorécepteurs et l'espace sous-rétinien sont dépourvus de cellules immunitaires grâce à l'effet immunosuppresseur de l'EPR (Streilein et al., 2002). Mais la forme sèche de la DMLA est caractérisée par un contexte inflammatoire chronique qui s'accompagne d'une forte accumulation de cellules immunitaires dans l'espace sous-rétinien, comprenant entre autres les macrophages et les microglies (Combadière et al., 2007). Les travaux précédents de notre équipe ont permis de montrer que dans l'atrophie géographique, des macrophages inflammatoires CCR2+ sont invariablement présents au niveau des lésions atrophiques, ainsi que dans la zone de transition (ZT) (Levy et al., 2015a; Sennlaub et al., 2013). La zone atrophique (ZA) est caractérisée par une absence totale d'EPR et par une très forte dégénérescence des photorécepteurs. Elle est bordée par une zone de transition, au niveau de laquelle l'EPR est toujours présent mais où l'on peut observer une forte perte des bâtonnets et un raccourcissement important des segments externes des cônes (Bird et al., 2014). Il est clairement établi qu'un dysfonctionnement de l'EPR - qui en conditions physiologiques assure de nombreuses fonctions favorisant la survie des photorécepteurs - conduit à l'apparition de modifications histo-pathologiques entraînant la dégénérescence des photorécepteurs (Mitamura et al., 2013). Notre groupe a montré l'impact de l'accumulation sous-rétinienne de phagocytes mononucléés re-larguant une grande quantité de médiateurs inflammatoires sur la survie des photorécepteurs (Hu et al., 2015; Sennlaub et al., 2013) et sur la physiologie de l'EPR (Mathis et al., 2017). Le premier objectif de ma thèse a consisté à déterminer si les phagocytes mononucléés sont capables d'induire la perte des segments des cônes comme on l'observe dans l'atrophie

géographique, et d'en déterminer le médiateur. Cette thématique est développée dans le premier article « Les phagocytes mononucléés sous-rétiniens induisent la perte des segments des cônes via IL-1 β ».

Nous avons ensuite cherché à comprendre comment l'IL-1 β induit l'apoptose des bâtonnets. En effet, des données publiées précédemment par notre équipe indiquent que les macrophages cultivés en présence d'explantats rétiniens induisent l'apoptose des bâtonnets (Sennlaub et al., 2013), et que cette dégénérescence est dépendante de la production d'IL-1 β (Hu et al., 2015). Dans la rétine, les photorécepteurs n'expriment pas ou très peu le récepteur à l'IL-1 β , IL-1R1 (Scuderi et al., 2015), contrairement aux cellules gliales de Müller (Liu et al., 2012; Namekata et al., 2008). La deuxième étape de ma thèse a donc consisté à caractériser les mécanismes à priori indirect par lesquels IL-1 β peut altérer la survie des bâtonnets, et tenter d'identifier un agent thérapeutique pouvant prévenir leur apoptose. Plusieurs études ont montré qu'IL-1 β n'exerce pas d'effet toxique direct sur les neurones, mais potentialise leur dégénérescence via son action sur les cellules gliales (Fogal et al., 2007) en induisant une augmentation de la libération de glutamate (Jackman et al., 2012b). Dans la rétine, IL-1 β induit une perturbation de l'homéostasie du glutamate en diminuant sa recapture par les cellules gliales de Müller (Chen et al., 2014). IL-1 β induit aussi l'augmentation de la transcription et de l'activité du transporteur cystine/glutamate x_c^- dans les cellules gliales, favorisant ainsi la sécrétion de glutamate (Fogal et al., 2007). Ces données suggèrent qu'IL-1 β pourrait affecter la survie des bâtonnets en perturbant l'homéostasie rétinienne du glutamate. Cette thématique est développée dans le deuxième article intitulé « La production d'IL-1 β par les phagocytes mononucléés sous-rétiniens induit la dégénérescence des bâtonnets en dérégulant l'homéostasie rétinienne du glutamate ».

RESULTATS

Article 1 : Les phagocytes mononucléés sous-rétiniens induisent la perte des segments des cônes via IL-1 beta :

1) Situation du sujet :

L'atrophie géographique, l'une des formes tardives de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), est caractérisée par une lésion atrophique qui s'étend progressivement. Cette lésion est définie par la perte de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), et la dégénérescence de la couche des photorécepteurs (Sarks, 1976). Au niveau de la zone de transition (ZT) située en périphérie de la zone atrophique (ZA), le nombre de bâtonnets chute brutalement (Bird et al., 2014; Curcio, 2001) ; le nombre de cônes ne diminue pas mais ceux-ci ont perdu leurs segments externes.

Nous avons montré précédemment que dans l'atrophie géographique, les phagocytes mononucléés – comprenant les monocytes, les macrophages et les microglies - sous-rétiniens s'accumulent au niveau de la zone atrophique et la zone de transition (Combadière et al., 2007; Levy et al., 2015a). Nous avons démontré que les macrophages CCR2+ provenant de la circulation sanguine participent systématiquement à l'infiltration sous-rétinienne dans la ZA et la ZT (Sennlaub et al., 2013). Chez la souris, le recrutement de monocytes circulants joue aussi un rôle majeur dans la dégénérescence des photorécepteurs (Cruz-Guilloty et al., 2013). Nous avons montré que les monocytes murins purifiés à partir de la moelle osseuse induisent *in vivo* et *in vitro* l'apoptose des bâtonnets (Sennlaub et al., 2013), et que cet effet est en partie causé par l'IL-1 β (Hu et al., 2015). Certains résultats suggèrent que les macrophages sous-rétiniens participent aussi à la dégénérescence des segments de cônes dans la rétinite pigmentaire (Gupta et al., 2003).

Nous proposons ici d'établir un lien entre l'accumulation sous-rétinienne de macrophages et l'atrophie des segments de cônes.

2) Résultats :

2.1) La présence de phagocytes mononucléés dans l'espace sous-rétinien est associée avec la perte des segments externes des cônes :

Nous avons analysé par immunohistochimie sur coupe de rétine humaine les populations de cônes et de bâtonnets chez des patients présentant une atrophie géographique, en les comparant à des patients sains. Nos résultats confirment que le nombre de bâtonnets est drastiquement réduit au niveau de la zone de transition, comme dans la zone atrophique ; le nombre de cônes est réduit d'environ 50% seulement au niveau de la zone atrophique. Ce résultat confirme les observations de Bird et al.

Nous avons ensuite réalisé des immuno-marquages sur rétines à plat, afin de révéler l'association entre la présence de phagocytes mononucléés CD14+ et la perte des segments de cônes. Nos résultats confirment la présence de macrophages CD14+ au niveau de la zone de transition. La reconstruction 3D des images acquises au microscope confocal nous a ensuite permis de montrer la perte presque totale des segments externes des cônes, associée à la présence de macrophages CD14+.

2.2) La culture d'explants rétiniens en présence de macrophages permet de reproduire la perte de segments de cônes :

Afin de reproduire *ex vivo* nos observations réalisées chez l'homme, nous avons adapté un modèle d'explants rétiniens utilisé précédemment (Hu et al., 2015), en cultivant des macrophages humains avec des explants rétiniens de primate ou de souris. Nous montrons ici que ce modèle de co-culture permet d'induire l'apoptose des bâtonnets. L'analyse des cônes montre qu'en présence de macrophages, leur nombre ne diminue pas, mais que leur segment externe est très fortement réduit.

2.3) L'IL-1 β induit la perte des segments de cônes *ex vivo* et *in vivo* :

Les macrophages humains étant facilement activables pour la production d'IL-1 β (Netea et al., 2009), nous avons cultivé des explants rétiniens en présence d'IL-1 β . Nous montrons ici que l'IL-1 β induit la perte des segments externes des cônes, et que l'utilisation de l'antagoniste IL-1Ra permet de prévenir la réduction des cônes induite par les macrophages. Ces résultats ont ensuite été confirmés *in vivo* dans un modèle d'inflammation sous-rétinienne induite chez la souris Cx3cr1^{-/-} par exposition à la lumière. Nous montrons que l'injection intra-vitréenne d'IL-1Ra permet là encore d'inhiber la perte des segments de cônes.

3) Conclusions :

Nos résultats démontrent l'association entre la présence de phagocytes mononucléés sous-rétiniens et la dégénérescence des segments externes de photorécepteurs en cônes. Les macrophages induisent un phénotype similaire *in vitro* et *in vivo*. Les données que nous avons obtenues montrent clairement que les macrophages participent aux mécanismes induisant la dégénérescence de la couche des photorécepteurs dans l'atrophie géographique, et que l'IL-1 β est le médiateur de cette toxicité.



Subretinal mononuclear phagocytes induce cone segment loss via IL-1 β

Chiara M Eandi^{1,2,3,4†}, Hugo Charles Messance^{1,2†}, Sébastien Augustin^{1,2}, Elisa Dominguez^{1,2}, Sophie Lavalette^{1,2}, Valérie Forster^{1,2}, Shulong Justin Hu^{1,2}, Lourdes Siquieros^{1,2}, Cheryl Mae Craft^{5,6,7,8}, José-Alain Sahel^{1,2,9}, Ramin Tadayoni^{1,2,10}, Michel Paques^{1,2,9}, Xavier Guillonau^{1,2‡}, Florian Sennlaub^{1,2**}

¹Sorbonne Universités, UPMC University Paris 06, INSERM, CNRS, Paris, France; ²Institut de la Vision, Paris, France; ³Department of Clinical Science, University of Torino, Torino, Italy; ⁴Eye Clinic, University of Torino, Torino, Italy; ⁵Mary D. Allen Laboratory for Vision Research, Keck School of Medicine of the University of Southern California, Los Angeles, United States; ⁶University of Southern California Eye Institute, Keck School of Medicine of the University of Southern California, Los Angeles, United States; ⁷Department of Ophthalmology and Cell, Keck School of Medicine of the University of Southern California, Los Angeles, United States; ⁸Department of Neurobiology, Keck School of Medicine of the University of Southern California, Los Angeles, United States; ⁹Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts, INSERM-DHOS CIC 503, Paris, France; ¹⁰Department of Ophthalmology, Hôpital Lariboisier, Paris, France

*For correspondence: florian.sennlaub@inserm.fr

†These authors also contributed equally to this work

‡These authors also contributed equally to this work

Competing interests: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 14

Received: 02 April 2016

Accepted: 19 July 2016

Published: 20 July 2016

Reviewing editor: Jeremy Nathans, Johns Hopkins University School of Medicine, United States

© Copyright Eandi et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Abstract Photo-transduction in cone segments (CS) is crucial for high acuity daytime vision. For ill-defined reasons, CS degenerate in retinitis pigmentosa (RP) and in the transitional zone (TZ) of atrophic zones (AZ), which characterize geographic atrophy (GA). Our experiments confirm the loss of cone segments (CS) in the TZ of patients with GA and show their association with subretinal CD14⁺ mononuclear phagocyte (MP) infiltration that is also reported in RP. Using human and mouse MPs in vitro and inflammation-prone *Cx3cr1^{GFP/GFP}* mice in vivo, we demonstrate that MP-derived IL-1 β leads to severe CS degeneration. Our results strongly suggest that subretinal MP accumulation participates in the observed pathological photoreceptor changes in these diseases. Inhibiting subretinal MP accumulation or IL-1 β might protect the CS and help preserve high acuity daytime vision in conditions characterized by subretinal inflammation, such as AMD and RP.

DOI: [10.7554/eLife.16490.001](https://doi.org/10.7554/eLife.16490.001)

Introduction

The macula consists of a small cone-dominated fovea, responsible for high acuity vision, surrounded by a rod-dominated parafovea and peripheral retina. Photo-transduction in cone segments (CS) are crucial for cone function and therefore high acuity and daytime vision. In geographic atrophy (GA), a late form of age-related Macular Degeneration (AMD), an extending atrophic zone (AZ) forms, characterized by the loss of the retinal pigment epithelium (RPE, a monolayer of cells with important functions in photoreceptor homeostasis) and degeneration of the photoreceptor cell layer (Sarks, 1976). The initial lesion in GA often develops parafoveally (Sarks et al., 1988) and slowly expands through the central retina and fovea, which leads to a severe drop in visual acuity. In the AZ, despite the absence of the RPE, residual cones survive, but they lack the cone segments (CS) (Bird et al., 2014). Similar findings are observed in disciform subretinal scars, the end-stage of

exudative AMD (Curcio, 2001). Surprisingly, in a transitional zone (TZ), just peripheral to the RPE-loss in the scar and AZ, the number of rods drops dramatically compared to the retina more distant from the lesion (Bird et al., 2014; Curcio, 2001). In contrast, the number of cones changes little in the TZ, but they lack their CS (Bird et al., 2014; Curcio, 2001). One could assume that the CS loss in the TZ of AMD patients is due to RPE dysfunction, but CS loss is also observed in retinitis pigmentosa (RP) patients with rod-gene mutations and unremarkable RPE (Mitamura et al., 2013).

Mononuclear phagocytes (MP) comprise a family of cells that include classical monocytes (Mo), macrophages (M ϕ), and microglial cells (MC) among others (Chow et al., 2011). We and others have shown that subretinal MPs accumulate in the AZ and on the apical side of the RPE of the TZ in patients with GA (Combadière et al., 2007; Gupta et al., 2003; Lad et al., 2015; Levy et al., 2015). We have recently demonstrated that numerous blood-derived MPs (CCR2-positive) invariably participate in the infiltration of both, the AZ and TZ (Sennlaub et al., 2013). In mice, the recruitment of blood-derived monocytes contributes importantly to autoimmune, photo-oxidative, and genetic photoreceptor degeneration (Rutar et al., 2012; Suzuki et al., 2012; Kohno et al., 2013; Cruz-Guiloty, 2013) and we demonstrated that bone-marrow derived murine monocytes induce rod apoptosis in vivo and in vitro (Sennlaub et al., 2013), which is in part mediated by IL-1 β (Hu et al., 2015). Interestingly, subretinal MPs also accumulate in RP secondarily to primary rod cell death, and have been suggested to induce the unexplained CS degeneration in these patients (Gupta et al., 2003).

We here confirm that the TZ is infiltrated by CD14⁺MPs and that rod photoreceptors and cone segments are lost in the TZ despite the presence of underlying RPE. Using co-cultures of human CD14⁺Mos and mouse bone-marrow derived Mos with retinal explants in vitro and inflammation-prone *Cx3cr1^{GFP/GFP}* mice in vivo, we show that MP derived IL-1 β induces CS degeneration additionally to previously reported rod apoptosis. Taken together, our results suggest that the presence of CD14⁺MPs in the subretinal space, not only observed in the TZ but also in patients with RP, participates in CS degeneration as they produce similar changes in vitro and in vivo.

Results

Cone and rod loss in relation to GA lesions

Bird and colleagues recently analyzed the loss of outer nuclear layer (ONL) nuclei and cone outer segments in GA using histology and electron microscopy (Bird et al., 2014). They reported that rod loss and cone outer segment degeneration occur peripheral to the margin of the RPE defect, in the transitional zone (TZ) (Bird et al., 2014). In this report, we analyzed the rod and cone populations in and around 10 atrophic zones (AZ) of 9 GA donor patients and in 6 control, non GA donor eyes using immunohistochemical techniques on paraffin sections with specific primary antibodies for rhodopsin, L/M-cone opsin, and cone arrestin, which allows identifying rod or cone photoreceptors even if they lost their outer segments. In the central region of control eyes, cone arrestin (green staining) -rhodopsin (red staining) double labeling visualized a 4 to 6 nuclei thick ONL, with cone segments (CS) and dendrites clearly demarcated by the cone arrestin immunological staining (Figure 1A, Hoechst blue staining of nuclei, RPE autofluorescence orange). The rod outer segments (OS) are strongly immunologically positive for rhodopsin staining, while the rod cell bodies stained more faintly, but enough to identify rod cell bodies (Figure 1A inset). The retina distant (>1000 μ m) from the RPE lesion in sections from donor eyes with GA was very similar to the control eyes (Figure 1B), featuring clearly marked cone arrestin⁺ CS (Figure 1B inset). In the TZ, close to the margin of the lesion but where RPE was still present, the ONL was irregular, thinned (around 2 nuclei of ONL), and cone and rod morphology was severely altered with the outer segments missing and the inner segments difficult to distinguish from the cell bodies (Figure 1C). The thinning and loss of segments was invariably found to extend peripherally to the margin of the RPE loss, into the TZ (Figure 1C, the autofluorescent RPE is visible in the left part of the micrograph, the arrow depicts the margin of the RPE with the atrophic zone to the right). The TZ, characterized by a thinned ONL in the presence of underlying RPE, was of variable length (200–800 μ m) in our samples similar to previous reports (Bird et al., 2014). Within the AZ residual cone arrestin⁺ cones, but also rhodopsin⁺ rods were observed in all but one analyzed samples, but their distribution was irregular and all photoreceptors lacked their OS (Figure 1D). L/M-cone opsin immunohistochemistry, which recognizes the opsins of the most abundant red and green cones, confirmed the CS loss in the TZ and AZ

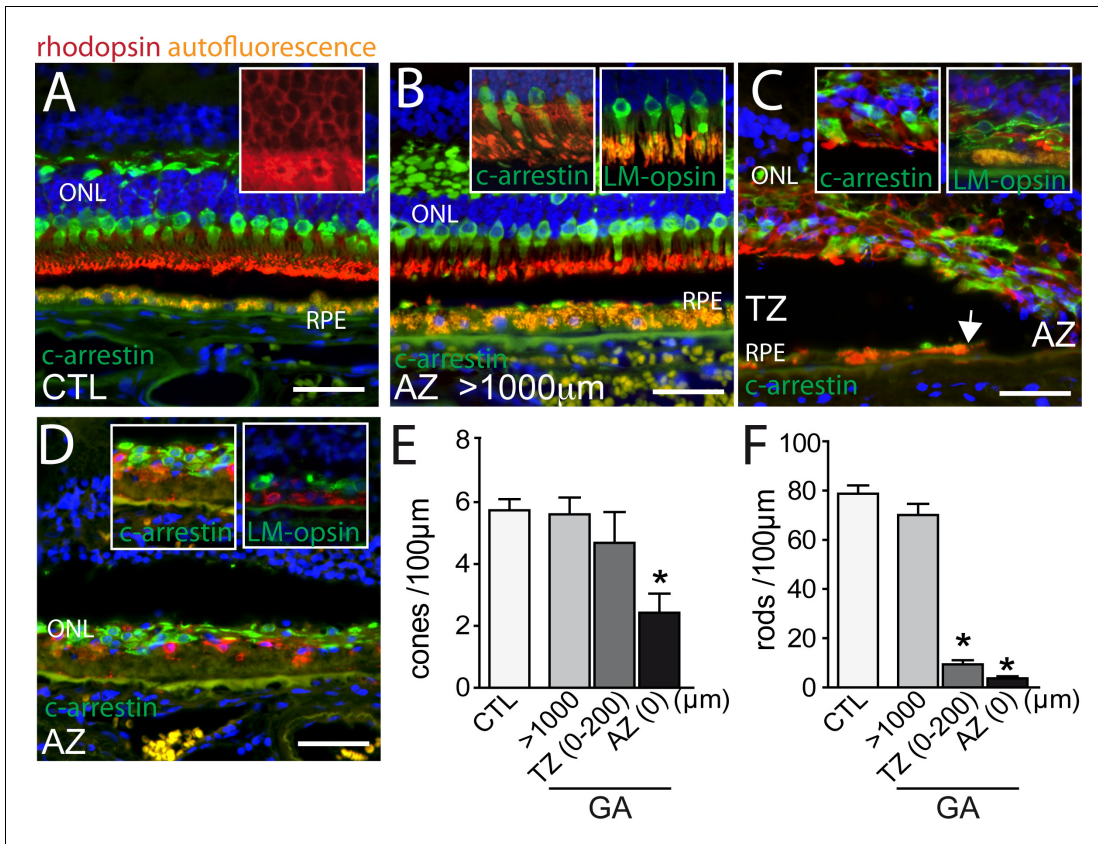


Figure 1. Rhodopsin, cone arrestin, and L/M cone opsin staining on central sections from control and geographic atrophy patients. (A–D) Representative micrographs of immunohistochemical detection of rhodopsin (red), cone arrestin (green, A–D and left insets of B, C and D), or L/M cone opsin (green, right insets of B, C and D) and Hoechst nuclear stain (blue, RPE autofluorescence visible in orange) on central sections of control donors (A) and donors with geographic atrophy (GA, panel B–D) at a distance greater than 1000 µm from the atrophic zone (AZ) (B), at the boundary of the AZ and transitional zone (TZ, panel C; white arrow indicates the margin of the autofluorescent RPE), and within the AZ (D). (E and F) Quantification of the number of arrestin⁺ cone somata (E, one way ANOVA, Dunnett’s post test *p=0,0024) and rhodopsin⁺ rod somata (F, one way ANOVA, Dunnett’s post test *p<0.0001) in control- and GA-donors (10 GA samples from 9 donors and in 6 control samples from 6 donors). ONL: outer nuclear layer; c-arrestin: cone-arrestin; RPE: retinal pigment epithelium; CTL: control; AZ: atrophic zone; TZ: transitional zone; GA: geographic atrophy. Scale bar = 50 µm.
DOI: 10.7554/eLife.16490.002

(Figure 1C,D insets). Next, we quantified cone arrestin⁺ cones (Figure 1E) and rhodopsin⁺ rods (Figure 1F) in the central retina of control eyes and eyes with GA lesions. The cone density at a greater than 1000 µm distance from the RPE-denuded AZ, was similar between control and GA eyes. In the atrophic zone the number of cone somata was significantly reduced to around half the numbers of controls (Figure 1E) and was not significantly different in the TZ (0–200 µm from the AZ, which is the TZ length invariably found in all donor eyes). Rod cell counts, on the other hand, revealed a slight decrease distant from the lesions, but a severe 90% reduction in the TZ compared to controls (Figure 1F). Interestingly, in all but one atrophic zone we also detected rhodopsin⁺ residual rods.

Taken together, our results confirm a severe rod cell loss in the TZ of patients with GA, where the RPE is still morphologically intact, while the number of cone numbers was relatively spared. However, cones of the TZ and residual rods and cones in the AZ had invariably lost their segments.

Subretinal CD14⁺ mononuclear phagocytes associate with cone segment loss in the transitional zone

Using pan- mononuclear phagocyte (MP) markers, we and others have previously shown that the subretinal space (i) above large Drusen (*Lad et al., 2015; Levy et al., 2015; Sennlaub et al., 2013*), (ii) within GA lesions (*Combadière et al., 2007; Gupta et al., 2003; Lad et al., 2015; Sennlaub et al., 2013; Penfold et al., 2001*), and (iii) in the TZ of patients with GA (*Levy et al., 2015; Sennlaub et al., 2013*) are infiltrated with MPs. We demonstrated that blood-born classical CD18⁺CCR2⁺Mos take part in the infiltrate at these three locations (*Sennlaub et al., 2013*). Circulating classical Mos also express high levels of CD14 (*Geissmann et al., 2003*), which is additionally expressed by other members of the MP family (*Gautier et al., 2012*) and is therefore not discriminative for infiltrating Mos versus resident MPs (unlike CCR2). We analyzed the presence of subretinal CD14⁺MPs and cone segment morphology on central RPE/choroid and retinal flat-mounts from 4 age-matched control donor eyes (*Figure 2A–D*) and 5 donor eyes with central GA lesions (*Figure 2E–H*), with particular attention to the TZ. Flat-mount immunohistochemistry facilitates the appreciation of cone outer segments and the detection of the smaller, dispersed MPs that are more difficult to detect on sections. We used CD14 immunohistochemistry to visualize MPs, peanut agglutinin (PNA) that stains inner and outer CS (but not cone cell bodies) (*Blanks and Johnson, 1984*),

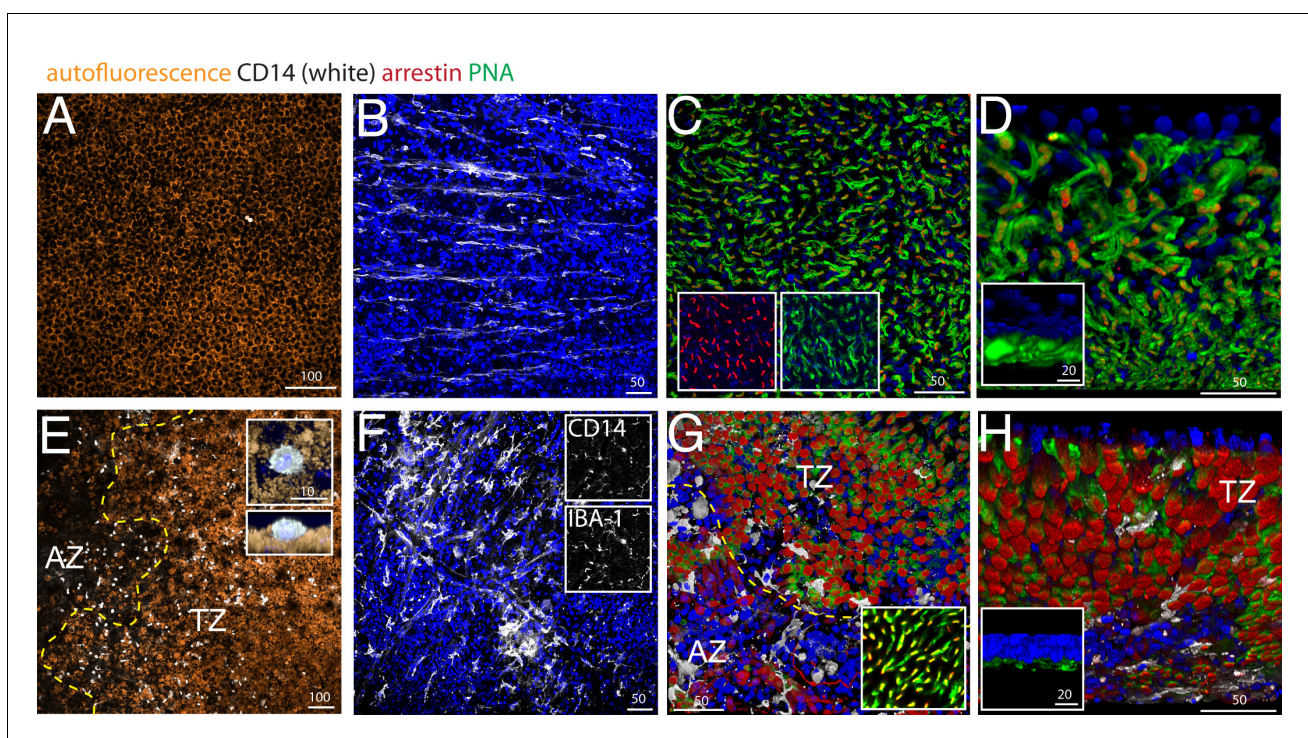


Figure 2. CD14, peanut agglutinin and cone arrestin staining on central flatmount preparations from control and geographic atrophy patients. Representative micrographs of immunohistochemical detection (confocal Z stack projections) of CD14 (white), cone arrestin (red), peanut agglutinin (PNA, green), and Hoechst nuclear stain (blue, RPE autofluorescence visible in orange) of RPE/choroid- (A and E) and retinal- flatmounts (B–D and F–H) of a control donor (A–D) and a donor with geographic atrophy (GA, panel E–H). (E) 3D reconstruction at higher magnification of a CD14⁺ cell on RPE flatmounts in an orthogonal (E, upper inset) and perpendicular (E, lower inset). (F) Representative confocal micrographs of CD14 (F, upper inset) -IBA-1 (F, lower inset) double labeling. (D and H) Oblique and perpendicular (insets) 3D reconstruction views of the outer aspect of the retinal flatmounts. The margin of the atrophic zone (AZ), recognized by the loss of RPE (E) and by the irregular cone distribution and a thinned outer nuclear layer (G) is indicated by the yellow dotted line. (G) PNA/arrestin pattern distant (>1000 μ m) from the AZ of a patient with GA (G inset). Experiments on flatmounts from 4 different control and patients with GA gave similar results. AZ : atrophic zone; TZ : transitional zone. Scale bars A and E = 100 μ m; B–C and F–G = 50 μ m; inset D and H = 20 μ m.

DOI: 10.7554/eLife.16490.003

and cone arrestin that stains cones irrespective of the presence of CS (see **Figure 1**). Central (1.5 cm around the fovea/center) retina/RPE/choroid complexes were dissected from the donor eyes and sectioned by radial incisions into 8 triangular pieces that each contain a parafoveal part in the case of control eyes and a central AZ, TZ, and non-atrophic more peripheral part for GA donor eyes. In GA tissues, the retinas of the AZ were carefully peeled from the RPE/choroid, as they adhere to Bruchs membrane in the area of RPE defects. This is not the case in the TZ, where the retina detaches easily from the underlying RPE, comparable to control retinas.

Confocal microscopy of CD14 stained central RPE confirmed that subretinal CD14⁺MPs are only very occasionally observed in healthy age-matched donors (**Figure 2A**, CD14 white staining, RPE orange autofluorescence). Within the AZ of patients with GA where the RPE has disappeared (**Figure 2E** right to the yellow dotted line, AZ), CD14⁺MPs were numerous, but were also always observed on the autofluorescent RPE in the TZ (**Figure 2E** left to the yellow dotted line, TZ), very similar to our published results using an IBA-1 antibody (Levy et al., 2015). A three dimensional reconstruction of an orthogonal and perpendicular close up view of a CD14⁺cell shows its position on the apical side of the CD14-negative RPE (**Figure 2E** insets). The RPE also expresses CD14, but to a much lesser extend compared to MPs (Elner et al., 2003), which might explain why the RPE did not appear CD14-positive in our experimental conditions. A comparative RT-PCR of CD14 in human blood-derived Mos versus human post-mortem RPE cells revealed a ten-fold stronger expression in Mo in our samples (data not shown).

On retinal flatmounts, confocal microscopy of CD14 (white staining) / cone arrestin (red staining) / PNA (green staining) / Hoechst nuclear stain (blue staining) immunohistochemistry of control retina shows the CD14⁺-resting MCs of the ganglion cell layer with their long processes (**Figure 2B**), while CD14⁺MCs of the central inner retina of patients with GA displayed an activated MC phenotype with shortened processes (**Figure 2F**). CD14⁺MCs also stained positive for the marker IBA-1, confirming their MP nature (**Figure 2F** insets). Orthogonal Z stack projections (**Figure 2C**), and oblique (**Figure 2D**) and perpendicular 3D reconstruction views (**Figure 2D** inset) of the outer aspect of the retinal flat-mounts reveal the normal cone arrestin⁺PNA⁺ segments of the central parafoveal retina in the absence of CD14⁺MPs. Retinal flat-mounts of the AZ and adjacent TZ of patients with GA (**Figure 2G** below and above the yellow dotted line, respectively) show CD14⁺MPs that stayed attached to the retina (white staining). In the AZ, recognizable by a severely thinned ONL and a slightly brown color in bright-field microscopy due to RPE-debris sticking to the subretinal aspect of the flat-mount, the PNA staining was much reduced, but cone arrestin⁺cone cell bodies were visible in reduced numbers and their distribution was irregular (**Figure 2G**). In the adjacent TZ cone arrestin⁺ cone density was relatively spared (**Figure 2G**). However, in both the AZ and TZ the typical cone arrestin⁺PNA⁺cone segment pattern had disappeared and cone arrestin immunological staining pattern of the remaining cone somata became apparent in the flat-mount, possibly because of greater antibody penetration in the thinned retinal flatmount. At a greater distance to the atrophic zone (>1000 μm), cone arrestin and PNA immunological staining located to cone segments, was indistinguishable to the pattern observed in flat-mounts from healthy donors (**Figure 2G** inset). Oblique (**Figure 2H**) and perpendicular 3D reconstruction views (**Figure 2H** inset) reveal the nearly complete loss of normal PNA⁺ cone segments in the transitional zone that is associated with the presence of CD14⁺MPs.

In summary, these results confirm the loss of cone inner and outer segments adjacent to the atrophic zone where the RPE is present that we observed in sections (**Figure 1**). They illustrate the close physical association of cone segment loss and CD14⁺Mos accumulation in the TZ.

Mononuclear phagocytes induce cone segment loss in retinal explants ex vivo

We have previously shown that wildtype- and in particular Cx3cr1-deficient-mouse bone marrow-derived monocytes (BMM) induce photoreceptor cell apoptosis in a monocyte/ mouse retinal explant co-culture system (Sennlaub et al., 2013). To analyze an eventual effect of human MPs on photoreceptors, we first co-cultured 100 000 human blood-derived CD14⁺Mos (hMo) adhering to polycarbonate filters floating on DMEM with C57BL/6 mouse retinal explants for 18 hr (with the photoreceptors facing the adherent Mos). Apoptosis was analyzed by TUNEL staining of the retinal explants cultured without Mos (**Figure 3A**), or with Mos (**Figure 3B**). TUNEL⁺ nuclei in the photoreceptor cell layer of retinal explants were more numerous in the presence of Mos. Double-

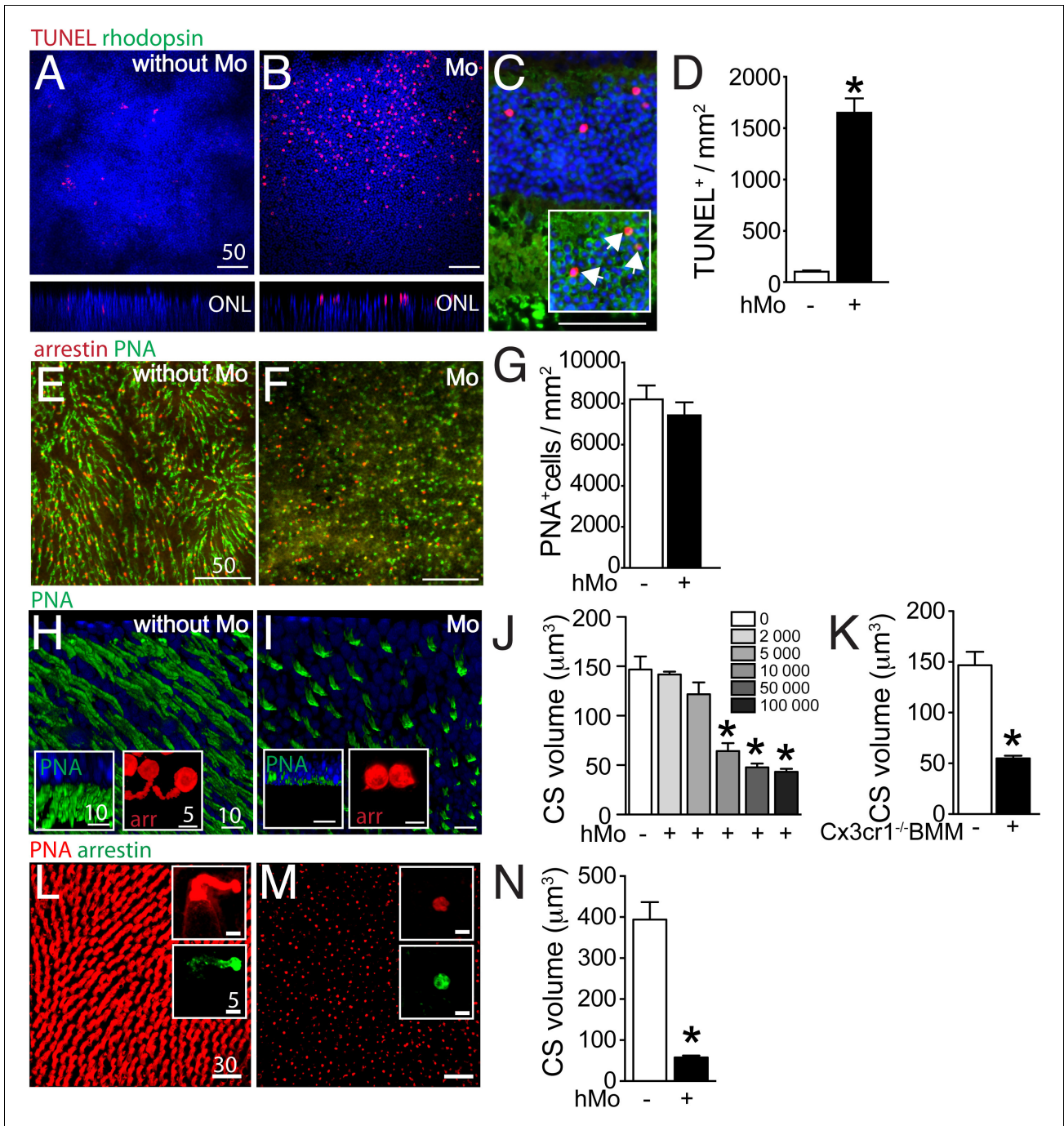


Figure 3. Evaluation of rods and cones in monocyte/retinal explant co-cultures. (A and B) Orthogonal projection of confocal Z stack images of the outer nuclear layer of TUNEL- (red), Hoechst nuclear dye- (blue) stained mouse retinal explants after 18 hr of culture (A) or co-culture with human monocytes (hMo, panel B). (C) TUNEL(red)/rhodopsin(green) co-staining of a section of a mouse retinal explant co-cultured with hMo (the inset represents a longer green exposure of the outer nuclear layer). (D) Quantification of TUNEL⁺ nuclei in mouse retinal explants cultured with or without hMo (n = 4/group, Mann Whitney *p=0,028). (E and F) Orthogonal projection of confocal Z stack images of the photoreceptor segments of mouse retinal explants after 18 hr of mono-culture (E) or co-culture with hMo (F) after cone arrestin (red)/peanut agglutinin (PNA, green) staining. (G) Quantification of cone numbers in retinal explants cultured with or without hMo (n = 10/group). (H and I) Oblique-, and perpendicular (insets) -3D Figure 3 continued on next page

Figure 3 continued

reconstruction views of confocal Z stack images of the photoreceptor segments of mouse retinal explants after 18 hr of mono-culture (H) or co-culture with hMo (I) after peanut agglutinin (PNA, green) and cone-arrestin (red, insets) staining. (J) Quantification of cone segment volume in mouse retinal explants cultured without or with the indicated numbers of hMos ($n = 6/\text{group}$, Mann Whitney $*p < 0,0004$). (K) Quantification of cone segment volume in mouse retinal explants cultured without or with 100 000 Cx3cr1-deficient bone marrow-derived Mos ($n = 4-6/\text{group}$, Mann Whitney $*p < 0,0061$). (L and M) Orthogonal-, and perpendicular (insets) -3D reconstruction views of confocal Z stack images of the photoreceptor segments of macaque retinal explants after 18 hr of mono-culture (L) or co-culture with hMo (M) after peanut agglutinin (PNA, red) and cone-arrestin (green) staining. (N) Quantification of cone segment volume in macaque retinal explants cultured without or with 100 000 hMos ($n = 8/\text{group}$, Mann Whitney $*p < 0,0002$). hMo/Mo : human monocyte; arr: cone-arrestin; CS : cone segments; PNA : peanut agglutinin. Scale bar : A-F = 50 μm ; H and I = 10 μm .

DOI: 10.7554/eLife.16490.004

immunological labeling for rhodopsin and TUNEL on sections prepared from the retinal explants revealed that the TUNEL⁺ nuclei of the ONL were positive for rhodopsin (Figure 3C inset) and not located at proximity to the inner segments, where cone nuclei are located (Figure 3C). Apoptosis was only observed in a minority of rods in these short-term co-cultures and rhodopsin⁺ rod segments were unremarkable in the culture condition (Figure 3C). Quantification of TUNEL⁺ nuclei/mm on 8 explants per group revealed a significant increase in TUNEL⁺ photoreceptors in co-culture with hMos compared to retinal explants cultured without hMos (Figure 3D) similar to co-cultures using Cx3cr1-deficient BMMs (Sennlaub et al., 2013). Next, we analyzed the cone population of PNA (green fluorescence) cone arrestin (red fluorescence) double-labeled mouse retinal explants after 18 hr of mono-culture (Figure 3E), or co-culture with hMos (Figure 3F). Quantification of cone arrestin⁺PNA⁺ cones (Figure 3G) revealed no influence of the presence of hMos on the number of cones after 18 hr of culture. However, the PNA-staining in hMo-exposed retinal flat-mounts appeared punctuated and the typical elongated shape of PNA⁺CS staining in retinas cultured without Mos had disappeared (Figure 3E and F). Oblique and perpendicular 3D reconstruction views of confocal microscopy Z-stacks of explant mono-cultures (Figure 3H), or co-culture with hMos (Figure 3I) reveals the near complete loss of PNA⁺CS in the hMo exposed explants. Similarly, arrestin staining revealed a severe shortening of arrestin⁺CS in the co-culture condition compared to controls (Figure 3H and I insets). Quantification of PNA⁺ volume (quantitated on the whole Z-stack, divided by the number of cones) in retinal explants co-cultured with increasing numbers of hMo confirms numerically a severe, significant reduction in PNA⁺CS volume as a function of hMos numbers (Figure 3J). To evaluate eventual artifacts due to interspecies incompatibilities we next quantified PNA⁺CS volumes of mouse retinal explants that we co-cultured for 18 hr with 100 000 Cx3cr1-deficient-mouse BMMs (which induces rod apoptosis similar to hMos [Sennlaub et al., 2013]). Our results revealed a similar, severe reduction in CS volume (Figure 3K). Furthermore, orthogonal 3D reconstruction views of confocal microscopy Z-stacks of PNA(red)/arrestin(green)-stained explants prepared from the para-central area of a non-human primate cultured without (Figure 3L), or with 100 000 hMos (Figure 3M) reveals a similar near complete loss of PNA⁺CS in the hMo exposed primate explants (Quantification Figure 3N). Again, the arrestin staining revealed a similar severe shortening of arrestin⁺CS (Figure 3L and M insets).

Taken together, our data show that Mos induce rod apoptosis and severe CS loss in a short-term retinal explant model. The CS loss was observed with the PNA and arrestin staining, with human blood-derived Mo and Cx3cr1-deficient-mouse BMMs, on mouse retinal explants and in explants from non-human primates, suggesting that the cone alterations were not the result of interspecies incompatibilities.

IL-1 β induces cone segment loss in retinal explant

Mos were not observed to physically infiltrate the outer segments or to ingest rhodopsin⁺ or PNA⁺ segments in the 18 hr co-culture (data not shown). Alternatively, the rapid CS reduction in the co-culture system might be due to the production of a secreted factor, such as inflammatory cytokines. We have previously shown that Cx3cr1-deficient mouse BMM induce rod apoptosis in the Mo/retinal explant co-cultures via IL-1 β (Hu et al., 2015). We showed that Cx3cr1-deficient BMMs constitutively secrete adenosine triphosphate (ATP), express increased surface P2RX7 receptor and secrete mature IL-1 β after transcriptional stimulation without a second exogenous stimulus (Hu et al., 2015), that is classically required for inflammasome activation and IL-1 β maturation (Schroder and Tschopp,

2010). Similarly, human blood monocytes constitutively release endogenous ATP, which leads to mature IL-1 β after transcriptional induction without a second exogenous stimulus (Netea et al., 2009). RT-PCRs of mRNA prepared from freshly isolated hMo, hMo cultured alone or with a retinal explant for 18 hr (both on polycarbonate filters) revealed that IL-1 β mRNA, but not IL18 mRNA, was significantly induced in hMos in the co-culture condition (Figure 4A), contrary to IL-6 and TNF α that were not induced (data not shown). PNA-staining of retinal explants cultured for 18 hr in the absence of Mos (Figure 4B) but with recombinant IL-1 β (Figure 4C), showed that IL-1 β was sufficient to severely reduce PNA⁺CS. Quantification of PNA⁺CS confirmed the significant, IL-1 β -induced volume loss (Figure 4D). In these experiments IL-1 β was used at a concentration of 50 ng/ml (in the range of concentration classically used in vitro) but the local IL-1 β concentration that cones are exposed to in the co-culture is difficult to estimate, as a gradient of IL-1 β is expected to form around the IL-1 β producing Mos. To directly evaluate the effect of locally produced IL-1 β we studied the effect of the IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) on the co-cultures. PNA-stained flatmounts of Mo/retinal co-cultures without (Figure 4E) or in the presence of IL-1Ra (Figure 4F) shows that IL-1 β -inhibition significantly protects against Mo-induced CS loss (Figure 4G).

In summary, these experiments show that IL-1 β , transcribed by Mos in the co-culture, is sufficient to induce CS reduction and necessary in Mo-induced CS loss.

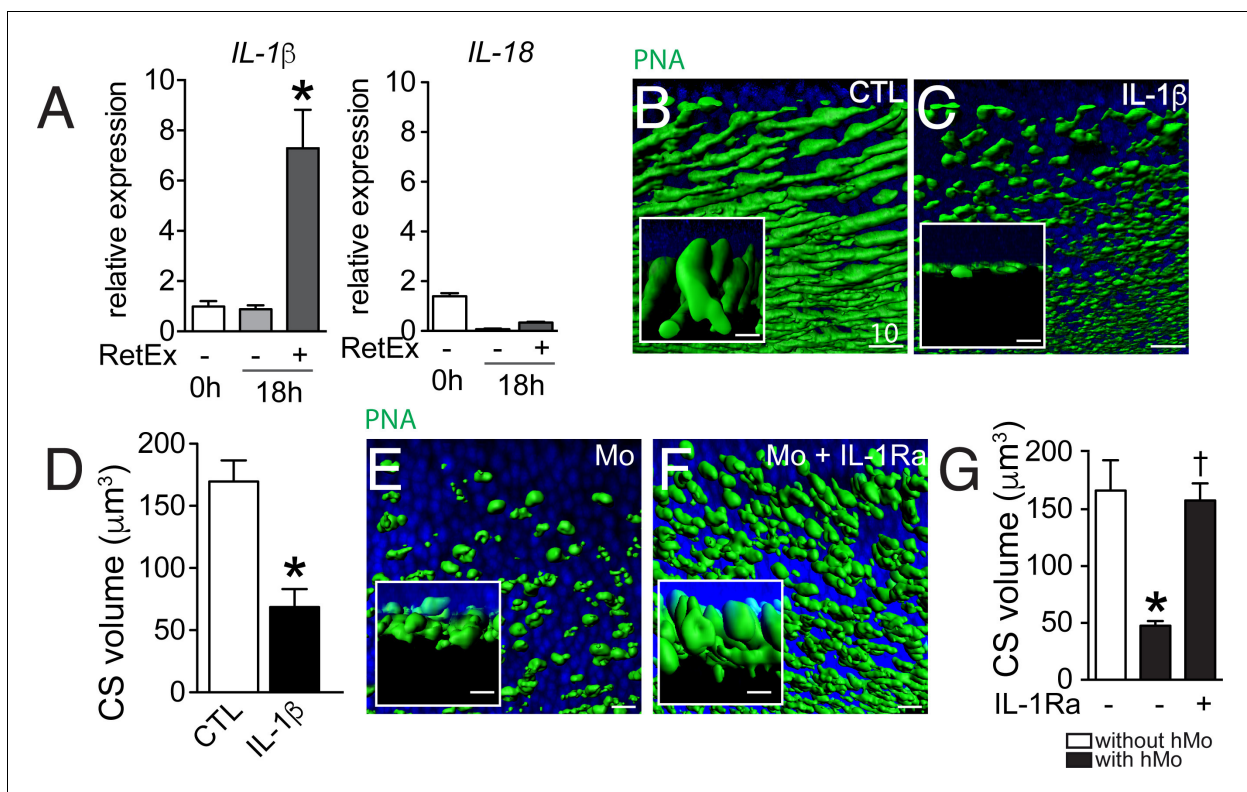


Figure 4. The influence of IL-1 β retinal explants co-cultures. (A) Quantitative RT-PCR of RT-PCR of IL-1 β and IL-18 normalized with S26 mRNA in fresh human monocytes (hMo), hMo cultured alone or with a retinal explant for 18 hr (both on polycarbonate filters, n = 5, ANOVA, Dunnett's post test *p=0,0079). (B and C) Oblique and perpendicular (insets) 3D reconstruction views of 18 hr peanut agglutinin (PNA)-stained retinal explant (B) and IL-1 β (50 ng/ml) exposed explant (C). (D) Quantification of cone segment volume in retinal explants cultured with or without IL-1 β (n = 6/group, Mann Whitney *p=0,0087). (E and F) Oblique and perpendicular (insets) 3D reconstruction views of 18 hr peanut agglutinin (PNA)-stained retinal explant co-cultured with human monocytes without (E) or with IL-1 receptor antagonist (F, 10 mg/ml). (G) Quantification of cone segment volume in Mo/retinal co-cultures with or without an IL-1 receptor antagonist (n = 6/group, Kruskal-Wallis, Dunn's post test *p=0,0022 versus 'without hMo'; †p=0,0182 versus "with hMo without IL1-Ra). RetEx: retinal explant; CTL: control; CS: cone segment; hMo: human Monocytes. Scale bar B, C, E, F = 10 μm .

DOI: 10.7554/eLife.16490.005

IL-1Ra inhibits cone segment loss in subretinal inflammation in vivo

Our data show that CS loss in the TZ is associated with CD14⁺MP infiltration of the subretinal space in patients with GA and that Mos, and more precisely Mo-derived IL-1 β , induce a similar effect in vitro. However, the in vitro co-culture system is by nature a very artificial model, characterized by an excess of Mos, the absence of an underlying RPE, and rod and cone segment degeneration occurring in hours rather than days and weeks. To evaluate if subretinal inflammation and IL-1 β secretion observed in vivo induce CS loss in the presence of the RPE, we used a light-challenge model of *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice. We have previously shown that *Cx3cr1* deficiency in mice (lacking the tonic inhibitory signal from CX3CL1 expressing neurons [Zieger et al., 2014; Silverman et al., 2003]) leads to a strong increase of subretinal MP accumulation with age from the age of 6 months (Combadière et al., 2007) or after light-challenge or laser-injury (Combadière et al., 2007; Raoul et al., 2008; Ma et al., 2009). We showed that the subretinal infiltrate in these mice is composed of a mixture of microglial cells and pathogenic blood-derived Mos similar to GA lesions (Combadière et al., 2013). We demonstrated that IL-1 β protein is increased in *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice with age (Lavalette et al., 2011) and after a 4 day acute light-challenge that it induces rod cell apoptosis without affecting RPE morphology (Hu et al., 2015). *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice do not develop Drusen and RPE atrophy, but they do model MP accumulation between the RPE and the photoreceptor segments, as well as some degree of associated rod degeneration (Combadière et al., 2007; Sennlaub et al., 2013; Hu et al., 2015), somewhat similar to the TZ of patients with GA (Figures 1 and 2). Eventual cone alterations in *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice have not yet been described. Orthogonal 3D reconstruction views of confocal microscopy Z-stacks of CS in PNA-stained retinal flat-mounts of 2–3 months old *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice kept under normal light conditions (Hu et al., 2015) (Figure 5A) displayed the typical elongated shape of PNA⁺CS staining similar to freshly extracted wildtype retinal flat-mounts (data not shown). In contrast, PNA⁺CS of 4 day light-challenged *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice that accumulate GFP⁺ subretinal MPs, were shortened and punctuated (Figure 5B) throughout the retinal flatmounts. Daily subcutaneous IL-1Ra injections during the light-challenge of *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice prevented the change in CS morphology despite the presence of GFP⁺MPs in the subretinal space (Figure 5C). Quantification of PNA⁺CS volume in control and light-challenged C57BL6/J and *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice revealed a significant decrease in the light-challenged *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice (Figure 5D). Strikingly, IL-1 β inhibition, which had no effect on subretinal MP accumulation (Figure 5E), completely prevented the loss of PNA⁺CS volume in the light-challenged mice (Figure 5D).

Taken together, our data show that subretinal inflammation, observed in light-challenged *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice in vivo is associated with IL-1 β -dependent PNA⁺CS degeneration in the presence of the RPE similar to the results we obtained with Mos and recombinant IL-1 β in vitro.

Discussion

Our immunohistological study of human donor eyes reveals severe rod cell loss, little cone loss but CS degeneration peripheral to the margin of the RPE lesion that defines GA, confirming a recent morphological study (Bird et al., 2014). As previously reported, this TZ, characterized by a thinned outer nuclear layer despite the presence of the RPE, was of variable length but found in all specimens. We also confirm a surprisingly important number of residual cones that lack their CS in the AZ (Bird et al., 2014; Curcio, 2001). Interestingly, rhodopsin immunohistochemistry also identified some residual, segment-lacking rhodopsin⁺ rods within the RPE lesion.

Other investigators and we have previously shown that AZs of patients with GA contain numerous subretinal MPs (Combadière et al., 2007; Gupta et al., 2003; Lad et al., 2015; Sennlaub et al., 2013; Penfold et al., 2001). We also demonstrated that IBA1⁺MPs, but also blood-derived CCR2⁺MPs, invade the subretinal space of the TZ (Levy et al., 2015; Sennlaub et al., 2013). In the current study, we used immunohistochemistry on flat-mount preparations with an antibody recognizing a co-receptor of the toll like receptor 2 and 4, CD14, to visualize the infiltration of CD14⁺MPs (blood- or tissue-derived MPs) beyond the AZ in the TZ. Co-staining for PNA and cone arrestin confirmed the presence of residual cones in the AZ and the severe CS degeneration in the TZ of retinal flat-mounts and illustrates the close physical association of CS degeneration with CD14⁺MPs.

It is not clear why CS degenerate in the TZ, where the RPE is present. The degeneration might be a result of dysfunctional RPE prior to its degeneration, suggested by the observation of

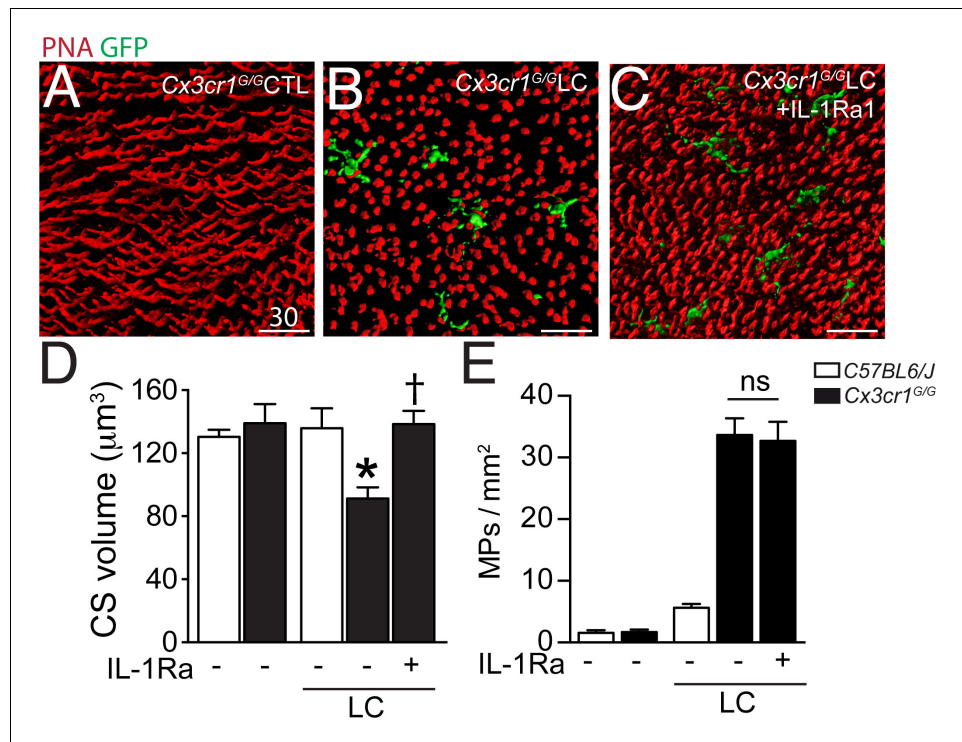


Figure 5. Cone segments in light-induced subretinal inflammation of C57BL/6/J and *Cx3cr1^{GFP/GFP}*-mice and the effect of pharmacological IL-1 β inhibition. (A–C) Orthogonal projections of confocal Z stack images of the photoreceptor segments of peanut agglutinin (PNA, red) stained *Cx3cr1^{GFP/GFP}*-mice (expressing GFP under the *Cx3cr1* promoter) that were kept under normal light conditions (A), or exposed to an inflammation-inducing light-challenge (LC) and treated with PBS (B) or IL-1 β receptor antagonist (C, IL-1Ra). (D and E) Quantification of cone segment volume (D) and subretinal mononuclear phagocytes (E) in normal light raised and LC-mice (n = 5–8/group; Kruskal-Wallis, Dunn’s post test *p=0,0109 versus *Cx3cr1^{GFP/GFP}*-mice in normal light; †p=0,0028 versus light-challenged *Cx3cr1^{GFP/GFP}*-mice). PNA: peanut agglutinin; GFP: green fluorescent protein; IL-Ra: IL-1 β receptor antagonist LC: illuminated/light-challenged. Scale bar 30 μ m.
DOI: 10.7554/eLife.16490.006

hyperfluorescence of the TZ (Sparrow *et al.*, 2010). However, to date, we do not know if the hyperfluorescence is due to an increase of fluorescent bisretinoids in the RPE (which could be a sign of RPE dysfunction), or to the superposition of several RPE cells or RPE-debris containing subretinal MPs in the TZ (Lad *et al.*, 2015; Sennlaub *et al.*, 2013; Gocho *et al.*, 2013; Zanzottera *et al.*, 2015). The observation that CS degeneration is also observed in RP patients with rod-gene mutations and unremarkable RPE (Mitamura *et al.*, 2013) further argues that an RPE-independent factor might participate in the degeneration.

Intriguingly, CS degeneration in RP (Gupta *et al.*, 2003), and as we show here in the TZ of patients with GA, is associated with the accumulation of subretinal MPs. We have previously shown that mouse MPs induce partial rod cell apoptosis in vivo and that wildtype mouse Mos and *Cx3cr1*-deficient Mos and MCs (characterized by excessive IL-1 β secretion) induce rod apoptosis in retinal explant co-cultures (Sennlaub *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2015). The influence of subretinal MPs on cones is unknown. Using Mo/retinal explant co-cultures, we here show that human blood-derived CD14⁺Mo induce some degree of rod apoptosis in retinal explants similar to mouse *Cx3cr1*-deficient mouse BMMs (Hu *et al.*, 2015). Interestingly, cone death was not observed, but all cones showed signs of severe CS degeneration. We show that IL-1 β was robustly transcribed in co-cultured Mos, that recombinant IL-1 β replicated CS degeneration, and that IL-1 β -inhibition reversed the Mo-induced CS degeneration.

The co-culture in vitro system, characterized by an excess of Mos, the lack of underlying RPE, mild rod apoptosis and quite severe CS degeneration occurring in hours rather than days and weeks, can however only be a rough approximation of the in vivo situation. The pattern of continuous rod (but not cone) apoptosis and CS degeneration over longer time periods would result in severe rod cell loss (as they don't regenerate), little cone loss but CS degeneration intriguingly similar to what is observed in the TZ of patients with GA.

To test whether IL-1 β -induced CS degeneration takes place in subretinal inflammation in vivo in the presence of the RPE, we analyzed cone morphology in inflammation-prone *Cx3cr1^{GFP/GFP}* mice. When subretinal MP accumulation was induced using a light-challenge (Hu et al., 2015), we observed CS degeneration, similar to the results we obtained with Mos in vitro. Furthermore, inhibition of IL-1 β , induced in these experimental conditions (Hu et al., 2015), prevented the CS degeneration in vivo, in accordance with the observation that IL-1 β potently induced CS degeneration in vitro.

Our study clearly demonstrates the association of subretinal MPs with CS degeneration in human samples and that MPs can induce a similar phenotype in vitro and in vivo, which strongly suggest that subretinal MPs participate in the degenerative changes in GA. Further studies of IL-1 β expression in human GA samples are needed to implicate this specific cytokine in the degenerative process in the human disease. However, IL-1 β has been shown to be strongly expressed in subretinal MPs of choroidal neovascular membranes in wet AMD (Oh et al., 1999) and CS degeneration is also observed adjacent to the fibrovascular membranes in disciform subretinal scars of wet AMD (Curcio, 2001). These observations suggest that an IL-1 β -dependent mechanism might exist in the human pathology.

Little is known about the cellular and molecular mechanisms of CS loss in GA. The observation that the degenerative changes appear peripheral to the RPE lesion and that similar changes are observed in RP (Gupta et al., 2003) and RP models (Punzo et al., 2009), suggest that other factors than RPE loss play a significant role. We clearly demonstrate that subretinal MPs, observed in both RP and the TZ, induce severe IL-1 β -dependent CS degeneration in the presence of morphologically normal RPE in vivo. Gupta et al. proposed several years ago that the subretinal inflammation secondary to rod degeneration in RP could be the 'missing link' to explain secondary CS and cone degeneration observed in RP (Gupta et al., 2003). CS maintenance in RP has recently been shown to depend on cone glucose uptake and aerobic glycolysis (Ait-Ali et al., 2015) that is stimulated by insulin (Punzo et al., 2009) and rod-derived cone viability factor (Ait-Ali et al., 2015). Inflammatory cytokines, including IL-1 β , inhibit insulin-dependent glucose uptake and are increasingly recognized to play an important role in insulin-resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes (Shoelson, 2006). IL-1 β -induced cone insulin resistance, decreased glucose uptake and subsequent cone starvation might explain the CS loss in RP and AMD.

Taken together, these results strongly suggest that infiltrating MPs observed in the TZ of patients with GA and in RP patients contribute importantly in the CS degeneration as they produce similar changes in vitro and in vivo. Inhibiting subretinal MP accumulation, or as we show IL-1 β inhibition, might help preserve CS and high acuity daytime vision in these patients.

Materials and methods

Donor eyes and immunohistochemistry

Donor eyes with a known history of AMD and controls were collected through the Minnesota Lions Eye Bank: 9 control maculae from 9 patients (5 men and 4 women; mean age 85 years \pm 2.4 SEM) and 15 GA donor maculae from 12 patients (5 men and 7 women; mean age 82.9 years \pm 2.2 SEM). Donor eyes without a history of eye disease and with a visible fovea on post-mortem funduscopy and a regular histology of the parafovea, recognizable by multilayered ganglion cell nuclei were used as control eyes. GA donor eyes had a known history of AMD, visible GA lesions on post-mortem fundus pictures, and histologically confirmed missing RPE and thinned photoreceptor cell layer in the lesion of the parafovea (multilayered ganglion cell layer) in the absence of subretinal vessels (as observed in neovascular AMD) or a fibroglial scar. Donor families gave informed consent in accordance with the eye bank's ethics committee. Postmortem fundus photographs were taken and the posterior segment was fixed 4 hr in 4% PFA, dissected, embedded in paraffin, and sectioned. The

anterior segment was dissected at the Minnesota Eye Bank, fundus photographs were taken, the posterior segment was fixed in PFA 4% for 4 hr and placed in ice cold PBS for shipping to our laboratory.

For immunohistochemistry on paraffin sections (5 control maculae from 5 patients and 10 GA donor maculae from 7 patients), the posterior segments were dissected to include the optic nerve, the macula and the central retina between the vessel arches, included in paraffin, and sectioned. The sections of the retina from donor eyes were stained as follow. After rehydration, antigen retrieval was performed in 70% formic acid for 15 min. After a pre-incubation step in 10% horse serum diluted in PBS 1X, slides were incubated with primary antibodies (anti-rhodopsin antibody [clone 4D2, Chemicon-Merck Millipore, Guyancourt, France; 1:500]; rabbit polyclonal anti-human cone arrestin antibody [DEI Luminaire Founder, Cheryl Craft; 1:25000] (Zhang *et al.*, 2001), L/M-cone opsin [Chemicon; 1:500]) and revealed with the appropriate secondary antibodies (Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France). Pictures of the retina were taken with a fluorescence microscope (Leica DM550B, Leica, Nanterre, France) and rods and cones quantified within the GA lesion, 0–200 μm and >200 μm from the lesion.

For flat-mount immunohistochemistry (4 age-matched control donor eyes and 5 donor eyes with central GA lesions), central (1.5 cm around the fovea/center) retina/RPE/choroid complexes were dissected from the donor eyes and sectioned by radial incisions into 8 triangular pieces that each contain a parafoveal part in the case of control eyes and AZ central, adjacent TZ, and non-atrophic peripheral part for GA donor eyes. In GA tissues, the retina of the atrophic part was subsequently carefully detached from underlying Bruch's membrane to which the atrophic retina is attached. Immunohistochemistry was performed on submerged samples with the primary antibodies anti-CD14 (MCA1218; 1:100 Serotec, Kidlington, UK), Peanut agglutinin Alexa 488 (ThermoFisher, Villebon-sur-Yvette, France; 1:50), anti-human cone arrestin antibody (LUMIF-hCAR; 1:10000), Hoechst nuclear stain (ThermoFischer; 1:1000), and revealed using appropriate fluorescent secondary antibodies (Molecular Probe). Preparations were observed with a Olympus FV1000 (Olympus, Rungis, France) confocal microscope.

Monocyte preparations, monocyte-retinal co-culture, and retinal explants

PBMCs were isolated from heparinized venous blood from healthy volunteer individuals. In accordance with the Declaration of Helsinki, volunteers provided written and informed consent for the human monocyte expression studies, which were approved by the Centre national d'ophtalmologie des Quinze-Vingt hospital (Paris, France) ethics committees (no. 913572). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from blood by 1-step centrifugation on a Ficoll Paque layer (GE Healthcare) and sorted with EasySep Human Monocyte Enrichment Cocktail (StemCells Technology, Grenoble, France). Human Mo were seeded on polycarbonate filters floating on DMEM for 2 hr. C57BL/6J mouse retina were prepared and placed with the photoreceptors facing 2000 to 100,000 adherent Mo for 18 hr at 37°C. In one set of experiments IL-1 β was inhibited by the IL-1 receptor antagonist (R&D, Lille, France, 10 mg/ml). Alternatively, retinal explants were cultured with recombinant IL-1 β (R&D; 50 ng/ml). In one set of experiments, we exposed eight 5 \times 5 mm (Sarks *et al.*, 1988) retinal explants dissected from the peri-central retina of a cynomolgus macaque to 100,000 human Mo or cultured eight explants without Mos. These experiments were done in accordance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. The donor retinal tissue samples were prepared from a control eye of an unrelated protocol that was approved by the Local Animal Ethics Committees and conducted in accordance with Directive 2010/63/EU of the European Parliament and French authorization C 92-032-02 regulation. The non human primate used in this study were cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) from foreign origin. *Macaca fascicularis* were housed under standard environmental conditions (12-h light–dark cycle, 22 \pm 1°C, 50% humidity) with free access to food and water. The animal was sacrificed by an overdose of barbiturate pentobarbital, the eyes were enucleated and retina dissected and prepared for retinal explant culture. For TUNEL staining (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics, Meylan, France) mouse retinal flat-mounts were fixed in 4% PFA for 30 min, washed in 1x PBS (pH 7.3), incubated for 90 min at 37°C with the reaction mixture and the reaction was stopped by washing with 1x PBS. For immunohistochemistry the flat-mounts were incubated with anti-mouse cone-arrestin antibody (Millipore, Guyancourt, France, #AB15282, 1:100; mouse retina explants) or rabbit polyclonal anti-human cone

arrestin antibody (DEI Luminaire Founder, Cheryl Craft; 1:25000; macaque retinal explants) and Peanut agglutinin Alexa 488 (ThermoFisher; 1:50; both mouse and macaque explants) overnight and revealed with an appropriate antibody (ThermoFisher). Nuclei were stained with Hoechst (ThermoFischer; 1:1000). Flat-mounts images were captured with a DM 5500 microscope (Leica) or an Olympus Confocal microscope. PNA⁺ cone S (CS) volume was quantified on confocal microscopy Z-stacks that encompass the 2 outermost nuclei of the ONL and the whole outer segments, and divided by the number of cones in the field.

Reverse transcription and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

RT-PCR was used to measure mRNA expression levels of *IL-1β*. Total RNA was extracted from fresh monocytes and monocytes cultured for 18 hr on polycarbonate filters floating on DMEM with or without an overlaying retinal explant using the Nucleospin RNA XS (740902, Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions and converted to cDNA using oligo (dT) as primer and Superscript II (Life Technologies). Each RT assay was performed in a 20 μL reaction. Subsequent RT-PCR was performed using cDNA, Sybr Green PCR Master Mix (Life Technologies) and the following sense and antisense primers: *IL-1β* (5'-CAT GGA ATC CGT GTC TTC CT-3' and 5'-GAG CTG TCT GCT CAT TCA CG-3'), *IL-18* (5'-GAC CAA GGA AAT CGG CCT C-3' and 5'-GCC ATA CCT CTA GGC TGG CT-3') or *RPS26* (5'-AAG TTT GTC ATT CGG ATT AAC-3' and 5'-AGC TCT GAA TCG TGG TG-3') (0.5 pmol/μL). Real-time PCR was performed using the Applied Biosystems StepOne real-time PCR systems (Applied Biosystems) with the following profile: 10 min at 95°C, followed by a total of 40 two-temperature cycles (15 sec at 95°C and 1 min at 60°C). To verify the purity of the products, a melting curve was produced after each run according to the manufacturer's instructions. Results were expressed as fold induction after normalization by *RPS26*.

In vivo light-challenge model

Cx3cr1^{GFP/GFP} mice were purchased from the Jackson Laboratories (Charles River Laboratories, Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France). All mice were negative for gene defects for the *Crb1^{rd8}*, *Pde6b^{rd1}*, and *Gnat2^{cpfl3}* mutations. Mice were housed in the animal facility under specific pathogen-free condition, in a 12 hr/12 hr light/dark (100–500 lux) cycle with water and normal diet food available *ad libitum*. All experimental protocols and procedures were approved by the local animal care ethics committee (N°00156.02).

Two- to three-month-old mice were adapted to darkness for 6 hr, pupils dilated and exposed to green LED light (starting at 2AM, 4500 Lux, JP Vezon equipment, Yzeure, France) for 4 days as previously described (Sennlaub *et al.*, 2013). Light-challenged mice were treated with daily subcutaneous injections of 100 μL of PBS or IL-1Ra (R&D; 1 mg/d/kg). On day 4, the mice were killed by CO₂ asphyxiation and enucleated. The globes were fixed in 4% PFA for 30 min, then rinsed in 1x PBS (pH 7.3). Retinal and RPE/choroid tissues were dissected intact from the globe, stained with Peanut agglutinin Alexa 594 (ThermoFisher; 1:50) and flat-mounted. Mononuclear phagocytes were visualized by using the *Cx3cr1* promoter-controlled GFP expression.

Quantification of cone outer segment volumes

Cone outer segment (OS) volumes were quantified using Imaris software (Bitplane) on stacks of confocal images which contain the entire photoreceptor outer and inner segments, of PNA-stained retinal flatmounts. 4 randomly chosen stacks (technical replicates) were taken per experimental retina or retinal explant. The software then calculated the volume of the PNA⁺ structures, which was subsequently divided by the number of PNA⁺ CS to yield the average individual CS volume in the stack. The CS volume of each retina or retinal explant (biological replicate) was calculated as the mean of the 4 individual stacks.

Statistical analysis

Sample sizes for our experiments were determined according to our previous studies. Each experiment with mouse retinal explants or light-challenge retina is representative of at least 3 independent experiments. Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software) was used for data analysis and graphic representation. Grubb's test was used to determine outliers. All values are reported as mean ± SEM. Statistical analysis was performed by one-way Anova analysis of variance followed by Bonferroni or

Dunnnett's post-test (multiple comparison of groups with equal variance and normal distribution), Kruskal-Wallis followed by a Dunns post-test (non-parametric multiple comparison of groups) or Mann-Whitney *U* test (non-parametric 2-group experiments) for comparison among means depending on the experimental design. The *n* and *p*-values are indicated in the figure legends.

Acknowledgements

We would like to thank Stéphane Fouquet and David Godefroy from the plateforme d'imagerie of the Institut de la Vision (IdV) for invaluable assistance in confocal microscopy. We are grateful to and Céline Nouvel Jaillard (IdV) and to Claire Maëlle Fovet et Joanna Demilly (MIRcen platform, CEA/INSERM, Fontenay-aux-Roses, France) for organizing and giving us access to cynomolgus macaques post-mortem retina for retinal explants. This work was supported by grants from INSERM, ANR blanc (MACLEAR, ANR- J15R365), Labex Lifesenses, Carnot, and by Association de Prévoyance Santé de ALLIANZ. Dr. Craft is the inaugural endowed Mary D Allen Chair in Vision Research, Doheny Eye Institute, and supported, in part, by NIH EY015851, EY03040 (DEI), and Research to Prevent Blindness (USC Ophthalmology).

Additional information

Funding

Funder	Grant reference number	Author
National Institutes of Health	EY015851	Cheryl Mae Craft
National Institutes of Health	EY03040	Cheryl Mae Craft
Association de Prévoyance Santé de ALLIANZ		Florian Sennlaub
Agence Nationale de la Recherche	MACLEAR, ANR- J15R365	Florian Sennlaub
Labex	LifeSenses	Florian Sennlaub
Carnot	International	Florian Sennlaub

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

CME, XG, FS, Conception and design, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Drafting or revising the article; HCM, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Drafting or revising the article; SA, ED, SL, SJH, LS, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data; VF, Acquisition of data; CMC, Contributed unpublished essential data or reagents; J-AS, RT, MP, Analysis and interpretation of data, Contributed unpublished essential data or reagents

Author ORCIDs

Chiara M Eandi, <http://orcid.org/0000-0003-3656-1689>

Xavier Guillonnet, <http://orcid.org/0000-0001-7379-3935>

Florian Sennlaub, <http://orcid.org/0000-0003-4412-1341>

Ethics

Human subjects: Volunteers provided written and informed consent for the human monocyte expression studies, which were approved by the Centre national d'ophtalmologie des Quinze-Vingt hospital (Paris, France) ethics committees (no. 913572)

Animal experimentation: All experimental protocols and procedures were approved by the local animal care ethics committee (00156.02; C 92-032-02)

References

- Ait-Ali N**, Fridlich R, Millet-Puel G, Clérin E, Delalande F, Jaillard C, Blond F, Perrocheau L, Reichman S, Byrne LC, Olivier-Bandini A, Bellalou J, Moysse E, Bouillaud F, Nicol X, Dalkara D, van Dorsselaer A, Sahel JA, Lèveillard T. 2015. Rod-derived cone viability factor promotes cone survival by stimulating aerobic glycolysis. *Cell* **161**:817–832. doi: [10.1016/j.cell.2015.03.023](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.023)
- Bird AC**, Phillips RL, Hageman GS. 2014. Geographic atrophy: a histopathological assessment. *JAMA Ophthalmology* **132**:338–345. doi: [10.1001/jamaophthalmol.2013.5799](https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2013.5799)
- Blanks JC**, Johnson LV. 1984. Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells. A species comparison. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **25**:546–557.
- Chow A**, Brown BD, Merad M. 2011. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nature Reviews Immunology* **11**:788–798. doi: [10.1038/nri3087](https://doi.org/10.1038/nri3087)
- 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-Y, Chauvaud D, Jeanny J-C, Chemtob S, Behar-Cohen F, Sennlaub F. 2007. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *Journal of Clinical Investigation* **117**:2920–2928. doi: [10.1172/JCI31692](https://doi.org/10.1172/JCI31692)
- Combadière C**, Raoul W, Guillonneau X, Sennlaub F. 2013. Comment on “Ccl2, Cx3cr1 and Ccl2/Cx3cr1 chemokine deficiencies are not sufficient to cause age-related retinal degeneration” by Luhmann et al. (*Exp. Eye Res.* 2013; 107: 80. doi: [10.1016/j.exer.2013.02.002](https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.02.002))
- Cruz-Guilloty F**, Saeed AM, Echeagaray JJ, Duffort S, Ballmick A, Tan Y, Betancourt M, Viteri E, Ramkhellawan GC, Ewald E, Feuer W, Huang D, Wen R, Hong L, Wang H, Laird JM, Sene A, Apte RS, Salomon RG, Hollyfield JG, et al. 2013. Infiltration of proinflammatory m1 macrophages into the outer retina precedes damage in a mouse model of age-related macular degeneration. *International Journal of Inflammation* **2013**:503725. doi: [10.1155/2013/503725](https://doi.org/10.1155/2013/503725)
- Curcio CA**. 2001. Photoreceptor topography in ageing and age-related maculopathy. *Eye* **15**:376–383. doi: [10.1038/eye.2001.140](https://doi.org/10.1038/eye.2001.140)
- Elnér VM**, Elnér SG, Bian ZM, Kindezeliskii AL, Yoshida A, Petty HR. 2003. RPE CD14 immunohistochemical, genetic, and functional expression. *Experimental Eye Research* **76**:321–331. doi: [10.1016/S0014-4835\(02\)00310-X](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(02)00310-X)
- Gautier EL**, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, Helft J, Chow A, Elpek KG, Gordonov S, Mazloom AR, Ma'ayan A, Chua WJ, Hansen TH, Turley SJ, Merad M, Randolph GJ, Immunological Genome Consortium. 2012. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature Immunology* **13**:1118–1128. doi: [10.1038/ni.2419](https://doi.org/10.1038/ni.2419)
- Geissmann F**, Jung S, Littman DR. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**:71–82. doi: [10.1016/S1074-7613\(03\)00174-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00174-2)
- Gocho K**, Sarda V, Falah S, Sahel J-A, Sennlaub F, Benchaboune M, Ullern M, Paques M. 2013. Adaptive optics imaging of geographic atrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **54**:3673–3680. doi: [10.1167/iovs.12-10672](https://doi.org/10.1167/iovs.12-10672)
- Gupta N**, Brown KE, Milam AH. 2003. Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research* **76**:463–471. doi: [10.1016/S0014-4835\(02\)00332-9](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(02)00332-9)
- Hu SJ**, Calippe B, Lavalette S, Roubeix C, Montassar F, Housset M, Levy O, Delarasse C, Paques M, Sahel JA, Sennlaub F, Guillonneau X. 2015. Upregulation of P2RX7 in Cx3cr1-deficient mononuclear phagocytes leads to increased interleukin-1 β secretion and photoreceptor neurodegeneration. *Journal of Neuroscience* **35**:6987–6996. doi: [10.1523/JNEUROSCI.3955-14.2015](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3955-14.2015)
- Kohno H**, Chen Y, Kevany BM, Pearlman E, Miyagi M, Maeda T, Palczewski K, Maeda A. 2013. Photoreceptor proteins initiate microglial activation via Toll-like receptor 4 in retinal degeneration mediated by all-trans-retinal. *Journal of Biological Chemistry* **288**:15326–15341. doi: [10.1074/jbc.M112.448712](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.448712)
- Lad EM**, Cousins SW, Van Arnam JS, Proia AD. 2015. Abundance of infiltrating CD163+ cells in the retina of postmortem eyes with dry and neovascular age-related macular degeneration. *Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* **253**:1941–1945. doi: [10.1007/s00417-015-3094-z](https://doi.org/10.1007/s00417-015-3094-z)
- Lavalette S**, Raoul W, Houssier M, Camelo S, Levy O, Calippe B, Jonet L, Behar-Cohen F, Chemtob S, Guillonneau X, Combadière C, Sennlaub F. 2011. Interleukin-1 β inhibition prevents choroidal neovascularization and does not exacerbate photoreceptor degeneration. *The American Journal of Pathology* **178**:2416–2423. doi: [10.1016/j.ajpath.2011.01.013](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.01.013)
- Levy O**, Calippe B, Lavalette S, Hu SJ, Raoul W, Dominguez E, Housset M, Paques M, Sahel JA, Bemelmans AP, Combadière C, Guillonneau X, Sennlaub F. 2015. Apolipoprotein E promotes subretinal mononuclear phagocyte survival and chronic inflammation in age-related macular degeneration. *EMBO Molecular Medicine* **7**:211–226. doi: [10.15252/emmm.201404524](https://doi.org/10.15252/emmm.201404524)
- Ma W**, Zhao L, Fontainhas AM, Fariss RN, Wong WT. 2009. Microglia in the mouse retina alter the structure and function of retinal pigmented epithelial cells: a potential cellular interaction relevant to AMD. *PLoS One* **4**:e7945. doi: [10.1371/journal.pone.0007945](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007945)
- Mitamura Y**, Mitamura-Aizawa S, Katome T, Naito T, Hagiwara A, Kumagai K, Yamamoto S. 2013. Photoreceptor impairment and restoration on optical coherence tomographic image. *Journal of Ophthalmology* **2013**:1–7. doi: [10.1155/2013/518170](https://doi.org/10.1155/2013/518170)

- Netea MG**, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, van de Veerdonk FL, Ferwerda G, Heinhuis B, Devesa I, Funk CJ, Mason RJ, Kullberg BJ, Rubartelli A, van der Meer JW, Dinarello CA. 2009. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* **113**:2324–2335. doi: [10.1182/blood-2008-03-146720](https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-146720)
- Oh H**, Takagi H, Takagi C, Suzuma K, Otani A, Ishida K, Matsumura M, Ogura Y, Honda Y. 1999. The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **40**:1891–1898.
- Penfold PL**, Madigan MC, Gillies MC, Provis JM. 2001. Immunological and aetiological aspects of macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research* **20**:385–414. doi: [10.1016/S1350-9462\(00\)00025-2](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(00)00025-2)
- Punzo C**, Kornacker K, Cepko CL. 2009. Stimulation of the insulin/mTOR pathway delays cone death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Nature Neuroscience* **12**:44–52. doi: [10.1038/nn.2234](https://doi.org/10.1038/nn.2234)
- Raoul W**, Keller N, Rodéro M, Behar-Cohen F, Sennlaub F, Combadière C. 2008. Role of the chemokine receptor CX3CR1 in the mobilization of phagocytic retinal microglial cells. *Journal of Neuroimmunology* **198**:56–61. doi: [10.1016/j.jneuroim.2008.04.014](https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.04.014)
- Rutar M**, Natoli R, Provis JM. 2012. Small interfering RNA-mediated suppression of Ccl2 in Müller cells attenuates microglial recruitment and photoreceptor death following retinal degeneration. *Journal of Neuroinflammation* **9**:221. doi: [10.1186/1742-2094-9-221](https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-221)
- Sarks SH**. 1976. Ageing and degeneration in the macular region: a clinico-pathological study. *British Journal of Ophthalmology* **60**:324–341. doi: [10.1136/bjo.60.5.324](https://doi.org/10.1136/bjo.60.5.324)
- Sarks JP**, Sarks SH, Killingsworth MC. 1988. Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium. *Eye* **2**:552–577. doi: [10.1038/eye.1988.106](https://doi.org/10.1038/eye.1988.106)
- Schroder K**, Tschopp J. 2010. The inflammasomes. *Cell* **140**:821–832. doi: [10.1016/j.cell.2010.01.040](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040)
- Sennlaub F**, Auvynet C, Calippe B, Lavalette S, Poupel L, Hu SJ, Dominguez E, Camelo S, Levy O, Guyon E, Saederup N, Charo IF, Rooijen NV, Nandrot E, Bourges JL, Behar-Cohen F, Sahel JA, 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 Molecular Medicine* **5**:1775–1793. doi: [10.1002/emmm.201302692](https://doi.org/10.1002/emmm.201302692)
- Shoelson SE**. 2006. Inflammation and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* **116**:1793–1801. doi: [10.1172/JCI29069](https://doi.org/10.1172/JCI29069)
- Silverman MD**, Zamora DO, Pan Y, Texeira PV, Baek S-H, Planck SR, Rosenbaum JT. 2003. Constitutive and inflammatory mediator-regulated fractalkine expression in human ocular tissues and cultured cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **44**:1608–1615. doi: [10.1167/iovs.02-0233](https://doi.org/10.1167/iovs.02-0233)
- Sparrow JR**, Yoon KD, Wu Y, Yamamoto K. 2010. Interpretations of fundus autofluorescence from studies of the bisretinoids of the retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **51**:4351–4357. doi: [10.1167/iovs.10-5852](https://doi.org/10.1167/iovs.10-5852)
- Suzuki M**, Tsujikawa M, Itabe H, Du ZJ, Xie P, Matsumura N, Fu X, Zhang R, Sonoda KH, Egashira K, Hazen SL, Kamei M. 2012. Chronic photo-oxidative stress and subsequent MCP-1 activation as causative factors for age-related macular degeneration. *Journal of Cell Science* **125**:2407–2415. doi: [10.1242/jcs.097683](https://doi.org/10.1242/jcs.097683)
- Zanzottera EC**, Messinger JD, Ach T, Smith RT, Curcio CA. 2015. Subducted and melanotic cells in advanced age-related macular degeneration are derived from retinal pigment epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **56**:3269–3278. doi: [10.1167/iovs.15-16432](https://doi.org/10.1167/iovs.15-16432)
- Zhang Y**. 2001. Cone arrestin expression and induction in retinoblastoma cells. In: Anderson R. E, LaVail M. M, Hollyfield J. G (Eds). *New Insights Into Retinal Degeneration Diseases*. Kluwer Academic, Plenum Publishers: New York. p 309–318. doi: [10.1007/978-1-4615-1355-1_33](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1355-1_33)
- Zieger M**, Ahnelt PK, Uhrin P. 2014. CX3CL1 (fractalkine) protein expression in normal and degenerating mouse retina: in vivo studies. *PLoS One* **9**:e106562. doi: [10.1371/journal.pone.0106562](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106562)

Article 2 : La production d'IL-1 β par les phagocytes mononucléés sous-rétiens induit la dégénérescence des bâtonnets en dérégulant l'homéostasie rétinienne du glutamate :

1) Situation du sujet :

La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA) est la première cause de déficience visuelle dans les pays industrialisés (Klein et al., 2004). L'atrophie géographique, l'une des formes cliniques de DMLA tardive, est caractérisée par une lésion progressive de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) et des photorécepteurs (PRs) (Sarks, 1976; Sarks et al., 1988). Dans l'atrophie géographique, les phagocytes mononucléés s'accumulent dans l'espace sous-rétinien (Gupta et al., 2003), et sont associés à la perte des photorécepteurs (Sennlaub et al., 2013). Nous avons montré que l'IL-1 β produite par les phagocytes mononucléés est responsable de la mort des bâtonnets (Hu et al., 2015) et de la perte des segments de cônes (Eandi et al., 2016).

La sécrétion d'IL-1 β est associée à de nombreuses pathologies neuro-dégénératives du système nerveux central (Koprach et al., 2008; Rossi et al., 2012; Shaftel et al., 2008), mais son récepteur IL-1R1 est faiblement exprimé chez les neurones par rapport aux cellules gliales (Huang et al., 2011). Il est généralement admis qu'IL-1 β n'est pas directement neurotoxique, mais potentialise la mort neuronale via les cellules gliales (Fogal et al., 2007) en induisant une libération excessive de glutamate (Jackman et al., 2012b). A l'état basal, la concentration extracellulaire de glutamate est très finement régulée (Jablonski et al., 2011; Reichenbach et al., 1993) afin ne pas atteindre une concentration excitotoxique pour les neurones (Ishikawa, 2013) comme les photorécepteurs (Delyfer et al., 2005). Dans la rétine, IL-1 β induit (i) une diminution de la recapture de glutamate par les cellules gliales de Müller (Chen et al., 2014) et (ii) augmente la transcription et l'activité du transporteur cystine/glutamate x_c⁻, favorisant la sécrétion de glutamate (Fogal et al., 2007).

Nous avons émis l'hypothèse que l'IL-1 β produite par les phagocytes mononucléés induit une perturbation de l'homéostasie du glutamate, entraînant l'augmentation de la concentration extracellulaire en glutamate et induisant la perte secondaire des bâtonnets.

2) Résultats :

2.1) IL-1 β induit indirectement la mort des bâtonnets :

Afin de confirmer le lien entre IL-1 β et dégénérescence des photorécepteurs, nous avons cultivé des explants rétiens de souris en présence d'IL-1 β : nos résultats montrent une augmentation significative du marquage TUNEL dans la couche des photorécepteurs. Nous montrons aussi que l'IL-1 β seule ne suffit pas à induire la mort de photorécepteurs

isolés, mais induit la modification de gènes impliqués dans la régulation homéostatique du glutamate sur explant entier. Nous observons une diminution de l'expression des transporteurs au glutamate, et une surexpression de l'échangeur cystine/glutamate x_c^- , associée à une augmentation de la concentration extracellulaire en glutamate

2.2) L'inhibition des récepteurs glutamatergiques prévient l'apoptose des bâtonnets :

L'IL-1 β induit une libération excessive de glutamate dans la rétine, et l'excès de glutamate induit un effet excitotoxique sur les neurones (Choi et al., 1987). Nous avons donc testé l'effet du CNQX - un inhibiteur des récepteurs glutamatergiques - sur des explants rétiniens cultivés en présence d'IL-1 β . Nous montrons que l'inhibition des récepteurs au glutamate suffit à prévenir la mort des bâtonnets induite par l'IL-1 β , suggérant l'induction d'un effet excitotoxique du glutamate.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons ensuite cultivé des explants rétiniens en présence d'une concentration élevée de glutamate. Nos résultats montrent que le glutamate seul suffit à induire l'apoptose des bâtonnets, mais n'induit pas la dégénérescence des segments externes des cônes.

2.3) La cystine exogène permet de sauver les photorécepteurs de la dégénérescence induite par l'IL-1 β :

L'inhibition des récepteurs glutamatergiques n'étant pas une perspective thérapeutique viable dans un tissu nerveux (Lees, 1998), nous avons testé l'effet de la cystine, un acide aminé essentiel à la synthèse du peptide antioxydant glutathion. Nos résultats montrent qu'une forte concentration de cystine permet d'inhiber la neuro-toxicité induite par l'IL-1 β .

3) Conclusions :

Les données que nous avons obtenues démontrent que la production d'IL-1 β induit une diminution de l'expression des transporteurs au glutamate, et une surexpression de l'échangeur cystine/glutamate x_c^- , aboutissant à l'augmentation de la concentration extracellulaire en glutamate. Nous montrons que l'excès de glutamate exerce un effet excitotoxique sur les bâtonnets et non les cônes, et que l'inhibition des récepteurs glutamatergiques non-NMDA protège les bâtonnets. Enfin, nos résultats suggèrent que l'utilisation de cystine est une perspective thérapeutique envisageable pour atténuer la toxicité induite par les macrophages contre les bâtonnets.

Article 2

IL-1 β production by mononuclear phagocytes induces retinal glutamate homeostasis disruption, resulting in rods degeneration

Hugo Charles-Messance^{1,2}, Fanny Beguier^{1,2}, Sara Touhami^{1,2}, Aude Couturier^{1,2,3}, Lourdes Siqueiros^{1,2}, Valérie Forster^{1,2}, Nour Barmo², Sébastien Augustin^{1,2}, José-Alain Sahel^{1,2,4}, Alvaro Rendon^{1,2}, Antje Grosche⁵, Ramin Tadayoni^{1,2,3}, Florian Sennlaub^{1,2}, Xavier Guillonneau^{1,2,\$}

¹Sorbonne Universités, UPMC University Paris 06, INSERM, CNRS, Paris, France; ²Institut de la Vision, Paris, France; ³Department of Ophthalmology, Hôpital Lariboisière, Paris, France; ⁴Centre Hospitalier National d'Ophthalmologie des Quinze-Vingts, INSERM-DHOS CIC 503, Paris, France; ⁵Department of Physiological Genomics, Ludwig-Maximilians-Universität München, Grosshaderner Str. 9, D-82152 Planegg-Martinsried, Germany.

\$ Correspondence should be addressed to Dr Xavier Guillonneau, Inserm, UMR_S 968, Institut de la Vision, Paris, F-75012, France. Tel: + (33) 1 53 46 26 94, Email: xavier.guillonneau@inserm.fr.

Abstract:

In geographic atrophy (GA), one of the late forms of Age-Related Macular Degeneration (AMD), an extending atrophic zone forms, characterized by the loss of the retinal pigment epithelium (EPR) and the degeneration of photoreceptors (PRs). Subretinal mononuclear phagocytes (MPs) accumulate in GA (Gupta et al., 2003; Sennlaub et al., 2013), and IL-1 β is responsible for MP-induced rod loss and cone segment degeneration (Eandi et al., 2016; Hu et al., 2015). We show that IL-1 β effect on rod degeneration is indirect, and mediated by glutamate, which extracellular concentration is increased in explants cultured with IL-1 β . Our results indicate that IL-1 β impairs Müller glial cells glutamate recycling, recapture and cystine antiport, and subsequently leads to the extracellular increase in glutamate content. Inhibiting glutamate receptors to prevent excitotoxicity, or exogenous cystine supplementation to supply antioxidant metabolism are sufficient to protect rods from IL-1 β -induced neurotoxicity. Our results will help to explore new perspectives to treat pathologies associated with subretinal inflammation such as late AMD.

Introduction:

Age-related Macular Degeneration (AMD) is the leading cause of irreversible blindness in the industrialized world (Klein et al., 2004). Geographic atrophy (GA), a clinical form of late AMD, is characterized by a slowly expanding lesion of the retinal pigment epithelium (RPE) and photoreceptor (PR) (Sarks et al., 1988). So far, there is no available treatment to stop or even slow the degeneration of PR and RPE cells, and spare vision in patients. Mononuclear phagocytes (MPs), a family of cells that include inflammatory monocytes (Mo), macrophages (M ϕ), and resident macrophages such as microglial cells (MCs) (Chow et al., 2011), accumulate in the subretinal space in GA in the atrophic region and the transitional zone (TZ) (Combadière et al., 2007; Guillonneau et al., 2017; Gupta et al., 2003; Sennlaub et al., 2013). We showed that subretinal MPs observed in aged- and light-challenged mice are in part derived from circulating inflammatory Mos, and were mainly responsible for the observed rod photoreceptor loss and cone outer segment degeneration via IL-1 β (Eandi et al., 2016; Sennlaub et al., 2013). Genetic or pharmacological inhibition of inflammatory MP recruitment strongly inhibits photoreceptor degeneration (Cruz-Guilloty et al., 2013; Guo et al., 2012; Kohno et al., 2013; Rutar et al., 2012; Sennlaub et al., 2013). Taken together, these results indicate that inflammatory cell derived-IL-1 β is responsible for the observed photoreceptor degeneration in GA patients.

The *Il-1 β* gene is transcribed after pro-inflammatory stimuli and encodes for the pro-IL-1 β protein. In human, the NLRP3 inflammasome is constitutively activated and IL-1 β precursor is spontaneously cleaved by caspase-1 to produce mature, secretable IL-1 β (Schroder and Tschopp, 2010). IL-1 β expression and secretion is increased in the CNS in acute and chronic neurodegenerative diseases (Shaftel et al., 2008) and in animal models (Eandi et al., 2016; Hu et al., 2015). Inhibiting IL-1 β greatly reduced neuronal cell death in models of acute injury and age-related neurodegenerative diseases (Cardona et al., 2006; Shaftel et al., 2008). However IL-1 β receptor IL-1RI is poorly expressed on neurons in comparison to glial cells (Huang et al., 2011), suggesting that IL-1 β neurotoxicity might be indirect. Indeed, it is generally believed that IL-1 β itself is not neurotoxic, but rather potentiate neuronal injury (Fogal et al., 2007). In the retina, IL-1RI immunoreactivity has been mainly observed on retinal astrocytes and Muller cells (Scuderi et al., 2015) and its expression on photoreceptors remains controversial, suggesting that IL-1 β neurotoxicity might be indirect as well. Multiple stimuli have been

shown to affect photoreceptor survival, including loss of trophic factors, metabolic changes, oxidative stress and loss of retinal homeostasis. In physiological conditions, glutamate homeostasis is finely tuned and excessive extracellular glutamate – released during neurotransmission - is uptaken through the excitatory amino acid transporters EAATs (mostly EAAT1/GLAST) into the Muller cells, to be converted into glutamine. Under pathological conditions, extracellular glutamate increases as a consequence of an altered glutamate uptake and/or release. Glutamate excess induces an excessive stimulation of the ionotropic receptors localized on retinal neurons - including rod and cone photoreceptors (Fletcher et al., 2000; Harvey and Calkins, 2002; Haumann et al., 2017; Jakobs et al., 2007), resulting in neuronal cell death. Glutamate excitotoxicity has been demonstrated to be a major threat for retinal neurons from the inner retina but also for photoreceptors (Delyfer et al., 2005). IL-1 β has been shown to modify glutamate homeostasis by (i) altering glutamate uptake and glutamine synthesis by Muller cells in models of ischemic retinopathies (Chen et al., 2014) and (ii) by increasing the transcription and the activity of the cystine/glutamate anti-porter system x_c⁻ in the hypoxic-ischemic brain astrocytes leading to exacerbated glutamate release (Fogal et al., 2007).

We previously showed that MPs are responsible for photoreceptor degeneration in an IL-1 β dependent mechanism. We hypothesized that subretinal MP-derived IL-1 β disrupts glutamate homeostasis, leading to neuronal photoreceptor cell death. We show that IL-1 β does not induce direct photoreceptor cell death, but induces extracellular glutamate accumulation. We show that CNQX - the inhibitor of non-NMDA glutamate ionotropic receptors - inhibits IL-1 β -induced rod photoreceptor cell death, but is unable to prevent cone segment shortening. The increase in extracellular glutamate content is the result of Müller glial impairment in glutamate recycling, recapture and cystine antiport, leading to a cystine lethal deficiency for rod photoreceptors.

Results:

IL-1 β induces rod photoreceptor degeneration via an indirect mechanism.

We previously demonstrated that monocyte-derived IL-1 β induces photoreceptor degeneration (Eandi et al., 2016; Hu et al., 2015). However, IL-1 β neurotoxic effect might not be direct (Dinarello, 2011). Indeed in the retina, IL-1RI immunoreactivity on photoreceptors remains controversial. As previously shown, treatment of retinal explant with IL-1 β resulted in a 3.3 fold increased in the number of TUNEL positive photoreceptor nuclei (Fig. 1A). In sharp contrast, addition of IL-1 β to isolated photoreceptor culture medium did not result in a detectable cellular loss (Fig. 1B), indicating that IL-1 β toxicity requires a non-photoreceptor cell population to induce photoreceptor degeneration. IL-1 β has been shown to disturb glutamate homeostasis (Prow and Irani, 2008; Ye et al., 2013) : therefore, we next quantified glutamate in the supernatant of retinal explant exposed or not to IL-1 β . We show that IL-1 β induced an increase in glutamate extracellular content from 270 to 508 μ M (Fig. 1C). Glutamate receptor over-stimulation by glutamate induced neuronal death in a variety of cellular models, including photoreceptor cell death (Delyfer et al., 2005). To evaluate the effect of extracellular glutamate increase, we next cultured retinal explant with glutamate, and analyzed cones and rods survival as previously described (Eandi et al., 2016). We here demonstrate that similar to IL-1 β , addition of glutamate to retinal explant culture medium leads to rod photoreceptor degeneration, with a 5.8 fold increase (Fig. 1D). In contrast to IL-1 β , glutamate does not induce cone outer segment (CS) shortening (Fig. 1E). Our results point at an indirect role of IL-1 β in rod photoreceptor degeneration, and show that glutamate is sufficient to induce rod apoptosis.

AMPA/kainate receptor signaling is involved in IL-1 β -mediated rod apoptosis but not cone degeneration.

In the retina, ionotropic glutamate receptors are mainly localized on neurons, including pre-synaptic rod and cone photoreceptors (Fletcher et al., 2000; Harvey and Calkins, 2002; Haumann et al., 2017; Jakobs et al., 2007). The over-stimulation of these receptors by glutamate leads to neuronal cell death in a process referred to as excitotoxicity. We first quantified glutamate receptor expression in retinal explants exposed or not to IL-1 β for 18h. Our results show that IL-1 β increases the mRNA expression of glutamate

receptors GluA-2, GluA-4 and GluK-1, thus possibly sensitizing neurons to glutamate excitotoxicity (Fig 2A-C). To evaluate a potential IL-1 β -induced excitotoxicity, we then cultured retinal explants exposed to IL-1 β with or without CNQX – a specific antagonist of AMPA/Kainate receptor - or MK-801 – a specific antagonist of NMDA receptors. CNQX prevented rod photoreceptor apoptosis induced by IL-1 β (Fig 2D,E), while MK-801 was inefficient to reduce rod degeneration (Data not shown). Knowing that MPs induce rod degeneration via IL-1 β , we next co-cultured retinal explants and human monocytes (hMos), and assessed the effect of CNQX when added to the culture medium. Similarly to IL-1 β , CNQX efficiently prevented monocyte-induced rod photoreceptor degeneration (Fig. 2F,G). Consistent with the absence of glutamate-induced cone segment degeneration, CNQX had no effect on IL-1 β - (Fig. 2H,I) or hMos-induced (Fig. 2J,K) CS degeneration. Taken together, our results indicate that MP derived degeneration results from ionotropic non-NMDA receptors stimulation.

IL-1 β disrupts glutamate homeostatic regulation in Müller glial cells.

In physiological conditions, Müller glial cells mediate glutamate uptake after synaptic release through excitatory amino acid transporters (EAATs) to avoid excitotoxic concentrations. Extracellular glutamate is mostly transported into the Müller cell through EAAT1/GLAST to be converted into glutamine; however, EAAT2 also contributes to the glutamate uptake (Niklaus et al., 2017). Conversely, glutamate can be released from glial cells by a cystine/glutamate transporter, the x_c⁻ system. Those two active transporters are regulated by IL-1 β (Prow and Irani, 2008; Shi et al., 2016). We previously found extracellular glutamate to be increased in retinal explant exposed to IL-1 β (Fig. 1C): we thus analyzed EAATs and x_c⁻ system expression in retinal explants treated or not with IL-1 β . First, to gain insight in the cellular distribution of these transporters, we isolated MPs and Müller cells from the retina by magnetic cell sorting (Grosche et al., 2016), and photoreceptors by differential centrifugation, and quantified genes involved in glutamate homeostasis by RT-qPCR. As expected, EAAT1 was almost exclusively expressed by the Müller cells (CD11b⁻CD31⁻CD29⁺ fraction), while EAAT2 was expressed by Müller cells, neurons (CD11b⁻CD31⁻CD29⁻ fraction) and photoreceptors (Fig. 3A). IL-1 β does not alter the expression of EAAT1 on retinal explants, but induces the down-regulation of EAAT2 mRNA expression (Fig.3 B). We next quantified the x_c⁻ system subunit xCT mRNA expression in the retinal fractions, and

found it highly expressed in the Müller cells, and to a lesser extent in PRs, but not in the CD11b⁺ microglial cell fraction (Fig.3 C). xCT expression was found to be upregulated by 3.0 fold in retinal explant cultured with IL-1 β . Consistently Nrf2, a transcription factor known to regulate xCT expression, was also found to be upregulated by 1.9 fold in the entire retina (Fig.3 D). RT-qPCR performed on isolated fractions from explants treated or not with IL-1 β revealed that xCT increased was mostly due to an upregulation of xCT mRNA expression in Müller glial cells, but not in neurons or isolated photoreceptors (Fig. 3E), suggesting that Müller cells contribute to x_c⁻ system-dependent extracellular glutamate increase. To evaluate the impact of IL-1 β on glutamate trafficking, we next quantified the expression of glutamine synthetase (GS) and the glutamate content in isolated Müller cells. GS expression was decreased by 2 fold (Fig. 3 F) after addition of IL-1 β . In control condition, glutamate is undetectable in isolated Müller cells, while after 18h of culture with IL-1 β , glutamate content increases to 770 pmol/cell (Fig.3 G). Our results thus indicate that IL-1 β impairs Müller cells capacity to recycle glutamate into glutamine, and upregulates the x_c⁻ system expression. All together IL-1 β increases glutamate availability in glial cell and favors its release from this compartment.

Microglial cells do not participate to glutamate homeostasis disruption induced by IL-1 β .

MPs produce large amount of IL-1 β , disturbing the ability of astrocytes (including Müller cells) to uptake glutamate; but they can also be a source of glutamate (Kigerl et al., 2012). We thus next quantified the effect of IL-1 β on microglial activation and glutamate production. Retinal explants were cultured for 18h in the presence or not of IL-1 β , and microglial cells were phenotyped. We show that IL-1 β induces resident microglia activation, as quantified by their cell perimeter reduction and cell soma area increase (Fig. 4A,B). However, the mRNA expression of xCT in microglial cells isolated from retinal explant exposed or not to IL-1 β was not found to be modified (Fig. 4C). We next exposed isolated retinal microglial cell to IL-1 β and quantified the extracellular glutamate in the supernatant. IL-1 β did not modify extracellular glutamate concentration (Fig. 4D), suggesting that microglial cells do not participate directly to the IL-1 β -induced glutamate homeostasis disruption.

Cystine protects PR cells from IL-1 β induced degeneration.

We have shown that IL-1 β -induced overexpression of xCT in Müller glial cells leads to an increase in extracellular glutamate (Fig. 1C and 3E). Therefore, photoreceptors are exposed to a potent excitotoxic stimulus. Contrary to Müller glial cells, photoreceptor x_c⁻ system is poorly expressed and is not upregulated by IL-1 β (Fig. 3C;E). We next hypothesized that high levels of extracellular glutamate could impair cystine/glutamate antiport by the x_c⁻ system, and result in a lack of intracellular cystine in photoreceptors. As cystine is required for the production of the antioxidant glutathione, cystine-deprived photoreceptor might be more susceptible to excitotoxic death. To address this hypothesis, we next cultured retinal explant with or without IL-1 β for 18h, and evaluated the ability of cystine to rescue photoreceptor from IL-1 β -induced degeneration. Our results show that cystine totally inhibited IL-1 β -induced photoreceptor cell death (Fig. 5A and B). In line with our previous results, dihydrokainic acid (DHK), a known inhibitor of EAAT transporters that induces extracellular glutamate accumulation (Matott et al., 2017), increases photoreceptor death in the absence of IL-1 β but did not exacerbate IL-1 β -induced photoreceptor cell death (Fig. 5C). Interestingly, DHK was sufficient to impair photoreceptor rescue mediated by exogenous extracellular cystine (Fig. 5C). This result suggests that cystine protective effect relies on a delicate balance between extracellular glutamate and cystine concentration.

Discussion:

IL-1 β -induced rod degeneration is dependent on non-NMDA glutamate signaling.

MPS-derived IL-1 β induces rod photoreceptor cell death by an unknown mechanism during experimental subretinal inflammation and GA (Hu, Calippe et al. 2015, Eandi, Messance et al. 2016). We here show that IL-1 β does not reduced the number of rods in isolated photoreceptor cell culture (Fig. 1 B), suggesting that IL-1 β neurotoxic effect is indirect as previously reported in various biological system (Fogal et al., 2007; Jackman et al., 2010; Koprlich et al., 2008). Multiple stimuli have been shown to affect photoreceptor survival, including loss of trophic factors, metabolic changes, oxidative stress and loss of glutamate homeostasis. We here show that IL-1 β induces an increase in retinal glutamate extracellular content (Fig. 1 C) and that glutamate alone is sufficient to induce rod photoreceptor apoptosis (Fig. 1 D). Glutamate may exerts its excitotoxic effect on neuron via the over-stimulation of inotropic glutamate receptor NMDA and non-NMDA (AMPA and Kainate) (Choi et al., 1987; Liu and Zukin, 2007). Our results show that CNQX prevented rod apoptosis in retinal explants cultured in the presence of IL-1 β or co-cultured with monocytes indicating that rod apoptosis is mediated by glutamate excitotoxicity induced through non-NMDA glutamate receptors (Fig. 4 D,E; 5 F,G). The inhibitor MK-801 was unable to prevent rod photoreceptors apoptosis indicating that rod photoreceptor degeneration is non-dependent on NMDA receptors. Consistent with our results, photoreceptor have been shown to express mainly non-NMDA receptors (Harvey and Calkins, 2002; Haumann et al., 2017; Jakobs et al., 2007). We showed in retinal explants exposed to IL-1 β that non-NMDA receptors AMPA-2, AMPA-4 and Kainate-1 were over-expressed, suggesting that IL-1 β exposure could further sensitize retinal neurons to glutamate-induced excitotoxicity.

Rod and cone degenerative pathways are distinct.

We show that glutamate is unable to reproduce IL-1 β -mediated cone segment shortening (Fig. 1 E) and that CNQX does not prevent cone segment reduction induced by IL-1 β or hMos (Fig. 5H-K). Mechanisms involved in cone segment shortening are thus different than those implied in rod photoreceptor degeneration. Indeed, cone segment maintenance depends on glucose uptake (Aït-Ali et al., 2015) and the stimulation of cone

glucose uptake by rod-derived cone viability factor (Ait-Ali et al., 2015) or insulin (Punzo et al., 2009). IL-1 β thus triggers independent cytotoxic for rods and cones. The mechanism by which IL-1 β alters cone segment remains to be determined, but likely involves a deregulation of cone metabolism.

IL-1 β impairs glutamate homeostasis in Müller cells.

We have shown that IL-1 β induces an increase in retinal glutamate extracellular content (Fig. 1 C). We assumed that it might result from an increased glutamate release through the upregulation of the cystine/glutamate antiporter x_c^- system (Fogal, Li et al. 2007), and/or a decreased glutamate uptake via the glutamate transporters EAATs (Chen et al., 2014). We showed that glutamate transporter EAAT2 mRNA levels were reduced in retinal explants cultured with IL-1 β , while EAAT1/GLAST transcription was unaffected (Fig. 3 B). EAAT2 is strongly expressed in Müller cells and has been shown to play a role in retinal glutamate homeostasis (Harada et al., 1998; Tse et al., 2014) in addition to the main EAAT1/GLAST glutamate transporter. We showed that dihydrokainic (DHK), a selective EAAT2 inhibitor, induced an increase in the number of TUNEL+ rods, confirming that inhibition of glutamate transport through EAAT2 is associated with rod apoptosis. Müller cells also displayed a reduced glutamine synthetase (GS) expression (Fig. 3 E). GS is an enzyme catalyzing the transformation of glutamate in non-toxic glutamine, and the reduction of its expression has previously been associated with Müller intracellular glutamate accumulation (Barnett et al., 2000). Accordingly, we measured an increased glutamate content in Müller glial cells after 18h of retinal explants culture with IL-1 β (Fig. 3 F). Müller cells express high level of the x_c^- system subunit, xCT. The x_c^- system is an antiporter uptaking cystine in exchange for glutamate release (Lewerenz et al., 2013): it is a vital antiporter, fueling cells with cystine (Mysona et al., 2009), an amino acid required for the synthesis of the antioxidant glutathione (Cooper and Kristal, 1997). We show that IL-1 β increases the expression of xCT in Müller cells but not in photoreceptors. Together with the increase in intracellular glutamate, it allows IL-1 β -stimulated Müller cells to import cystine and release glutamate. Depending on the context, the x_c^- system appears to have ambivalent effects on neuronal survival: in some models, its inhibition has been linked to oxidative stress accumulation – resulting from glutathione deprivation – and neuronal cell death (Murphy et al., 1989; Shih et al., 2006), and in others, its increased function was

associated with neuronal apoptosis (Domercq et al., 2007; Fogal et al., 2007; Liu et al., 2014). We here showed that x_c^- system over-expression is associated with neuronal cell death. Taken together, our data suggest that IL-1 β -induced glutamate recycling disruption in Müller glia, exaggerated glutamate release by the Müller x_c^- system and reduction of EAAT2 glutamate uptake. This disruption in glutamate homeostasis providing Müller cells with cystine, a precursor of a potent antioxidant at the photoreceptor's expense.

Cystine rescue rod photoreceptors from IL-1 β induced degeneration.

In contrast to Müller cells, photoreceptors express low levels of xCT, and its expression is not upregulated by IL-1 β . We thus hypothesized that photoreceptors were unable to import cystine when retinal explants were cultured with IL-1 β . To rescue photoreceptors, we thus added cystine to IL-1 β treated retinal explant, to allow photoreceptor to uptake cystine even in a context of high extracellular levels of glutamate. As shown in Fig. 5, 1mM cystine was sufficient to prevent rod apoptosis (Fig. 5 A,B). Our data thus suggest that favoring the import of cystine and the subsequent production of antioxidant in photoreceptor allowed these cells to resist IL-1 β -induced stress, and point at a delicate balance between extracellular glutamate and cystine concentration. To further emphasize the importance of this balance between glutamate and cystine, we cultured explants with IL-1 β , cystine and DHK to further inhibit glutamate uptake by Müller cells. We showed that addition of DHK was enough to re-orientate the cystine/glutamate balance in disfavor of photoreceptor survival.

Geographic atrophy is characterized by subretinal inflammation. Mononuclear phagocyte accumulates in contact with rod and cones photoreceptor and trigger photoreceptor degeneration in an IL-1 β dependent mechanism. We here show that IL-1 β degeneration is due to an increased glutamate extracellular concentration and impaired cystine transport in photoreceptor. Our data point at different therapeutic options including glutamate signaling inhibition, x_c^- inhibition or cystine supplementation. The two first options would lead to an inhibition of neurons-neurons communication and a loss of GSH antioxidant protection respectively. We here show that cystine supplementation appears as an alternate and attractive mean to prevent rod photoreceptor degeneration during subretinal inflammation.

Materials and methods:

Mice

C57Bl6/J male mice were obtained from JANVIER Lab. The mice were aged between 8 and 15 weeks, and were kept under specific pathogen-free condition in a 12 hr/12 hr light/dark (100 lux) cycle with no additional cover in the cage and with water and normal chow diet available ad libitum.

Cell sorting

Isolated retinæ were incubated with papain (0.2 mg/ml, Roche, Mannheim, Germany) in Ca²⁺ -/Mg²⁺ -free phosphate-buffered saline containing 11 mM glucose, pH 7.4, for 30 min at 37 °C, followed by several washing steps with saline. After short incubation in saline supplemented with DNase I (200 U/ml), the tissue was triturated in extracellular solution (ECS, that contained (mM) 135 NaCl, 3 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1 Na₂HPO₄, 10 HEPES, and 11 glucose, adjusted to pH 7.4 with Tris) to obtain isolated retinal cells. After centrifugation, the supernatant was removed and the cells were resuspended and incubated in ECS containing biotinylated hamster anti-CD29 (clone Ha2/5, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) for 15 min at 4 °C. After washes in ECS and centrifugation, cells were taken up in ECS containing anti-biotin MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and incubated for 10 min at 4 °C. After an additional washing step in ECS, cell populations were separated using MACS® cell separation large cell columns (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's recommendation. If microglia cells were isolated in addition to Müller cells, the retinal suspension was incubated with CD11b-microbeads (Miltenyi Biotec) for 15 min at 4 °C and positively selected using MACS® cell separation large cell columns (Miltenyi Biotec) before Müller cells were surface-labeled for MACS sorting.

Glutamic acid assay

Glutamate concentration was assessed in the supernatant of retinal explants cultured for 18hr with or without IL-1 β , or in Müller cell lysate obtained after cell sorting. In the assay, L-glutamic acid is oxidized by glutamate oxidase to produce α -ketoglutarate, NH₃ and hydrogen peroxide (H₂O₂). L-alanine and L-glutamate-pyruvate transaminase are included in the reaction to regenerate L-glutamic acid by transamination of α -ketoglutarate, resulting in multiple cycles of the initial reaction and a significant amplification of the H₂O₂ produced. The H₂O₂ reacts with Amplex™ Red reagent (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) in a 1:1 stoichiometry in the presence of horseradish peroxidase (HRP) to generate the highly fluorescent product, resorufin. This series of reactions allows for the quantification of glutamic acid based on resorufin fluorescence. Because resorufin has a fluorescence emission maximum of approximately 585 nm, there is little interference from autofluorescence in most biological samples. Reactions were conducted according to the manufacturer's instructions (MyQubit Amplex™ Red

Glutamic Acid Assay, Invitrogen).

Monocytes preparations, monocyte-retinal co-culture, and retinal explants

PBMCs were isolated from heparinized venous blood from healthy volunteer individuals. In accordance with the Declaration of Helsinki, volunteers provided written and informed consent for the human monocyte expression studies, which were approved by the Centre national d'Ophthalmologie des Quinze-Vingt hospital (Paris, France) ethics committees (no. 913572). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from blood by 1-step centrifugation on a Ficoll Paque layer (GE Healthcare) and sorted with EasySep Human Monocyte Enrichment Cocktail (StemCells Technology, Grenoble, France). Human Mos were seeded on polycarbonate filters floating on DMEM for 2 hr. C57BL/6J mouse retina were prepared and placed with the photoreceptors facing 100,000 adherent Mos for 18 hr at 37°C. In the set of experiments, IL-1 β (R&D; 10 ng/ml), glutamate (1mM), cystine (1mM), CNQX (100uM) or dihydrokainic acid (100uM) were used. For TUNEL staining (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics, Meylan, France) mouse retinal flat-mounts were fixed in 4% PFA for 30 min, washed in 1x PBS (pH 7.3), incubated for 90 min at 37°C with the reaction mixture and the reaction was stopped by washing with 1x PBS. For immunohistochemistry the flat-mounts were incubated with Peanut agglutinin Alexa 488 (Thermofisher; 1:50) or Iba-1 (Abcam; 1:400) overnight, and revealed with an appropriate antibody (Thermofisher). Nuclei were stained with Hoechst (Thermofischer; 1:1000). Flat-mounts images were captured with an Olympus Confocal microscope. PNA+cone S (CS) volume was quantified on confocal microscopy Z-stacks that encompass the 2 outermost nuclei of the ONL and the whole outer segments, and divided by the number of cones in the field.

Quantification of cone outer segment volumes

Cone outer segment (OS) volumes were quantified using Imaris software (Bitplane) on stacks of confocal images, which contain the entire photoreceptor outer and inner segments, of PNA-stained retinal flatmounts. 4 randomly chosen stacks (technical replicates) were taken per retinal explant. The software then calculated the volume of the PNA+ structures, which was subsequently divided by the number of PNA+ CS to yield the average individual CS volume in the stack. The CS volume of each retinal explant (biological replicate) was calculated as the mean of the 4 individual stacks.

Reverse transcription and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

RT-PCR was used to measure mRNA expression levels. Total RNA was extracted from cell fractions isolated from retinal explants, or total retinal explants, cultured for 18 hr on polycarbonate filters floating on DMEM using the Nucleospin RNA (740955, Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions and converted to cDNA using oligo (dT) as primer and Superscript II (Life Technologies).

Each RT assay was performed in a 20 mL reaction. Subsequent RT-PCR was performed using cDNA, Sybr Green PCR Master Mix (Life Technologies) and the following sense and antisense primers: AMPA-2 (5'-AAT GTG GAG CCA AGG ACT CG-3' and 5'- CCA GCA TTG CCA AAC CAA GG -3'), AMPA-4 (5'-CGC CTA CTC TTG GCA ATG AC-3' and 5'-GTC GAA CAG CGC AGA ACT C-3'), Kainate-1 (5'-TGC AGG ACT CGT CCT TTC TG-3' and 5'-GTG AGA TTC CCA GCT CTT CC-3'), EAAT1 (5'-TCA ATG CCC TGG GCC TAG TTG T-3' and 5'-GGG TGG CAG AAC TTG AGG AGG-3'), EAAT2 (5'-CCT CCA TCT GAG GAG GCC AAT-3' and 5'-CAG CTG CCT AGC AAC CAC TTC T-3'), Nrf2 (5'-TGC CCC TCA TCA GGC CCA GT-3' and 5'-GCT CGG CTG GGA CTC GTG TT-3'), xCT (5'-AAA CTT GCT AAG CTC TGT GTT GG-3' and 5'-CAC ATC ACA TGT TTG TAC ACT CG-3'), GS (5'-CCC CAA CAA GCT GGT GCT AT-3' and 5'-TCC ATT CCA AAC CAG GGG TG-3') S26 (5'-AAG TTT GTC ATT CGG ATT AAC-3' and 5'-AGC TCT GAA TCG TGG TG-3') (0.5 pmol/mL). Real-time PCR was performed using the Applied Bio- systems StepOne real-time PCR systems (Applied Biosystems) with the following profile: 10 min at 95°C, followed by a total of 40 two-temperature cycles (15 sec at 95°C and 1 min at 60°C). To verify the purity of the products, a melting curve was produced after each run according to the manufacturer's instructions. Results were expressed as fold induction after normalization by RPS26.

Statistical analysis

Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software) was used for data analysis and graphic representation. All values are reported as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed by one-way Anova analysis of variance followed by Bonferroni or Dunnett's post-test (multiple comparison of groups with equal variance and normal distribution), Kruskal-Wallis followed by a Dunns post-test (non-parametric multiple comparison of groups) or Mann-Whitney U test (non-parametric 2-group experiments) for comparison among means depending on the experimental design. The p-values are indicated in the figure legends.

Figures:

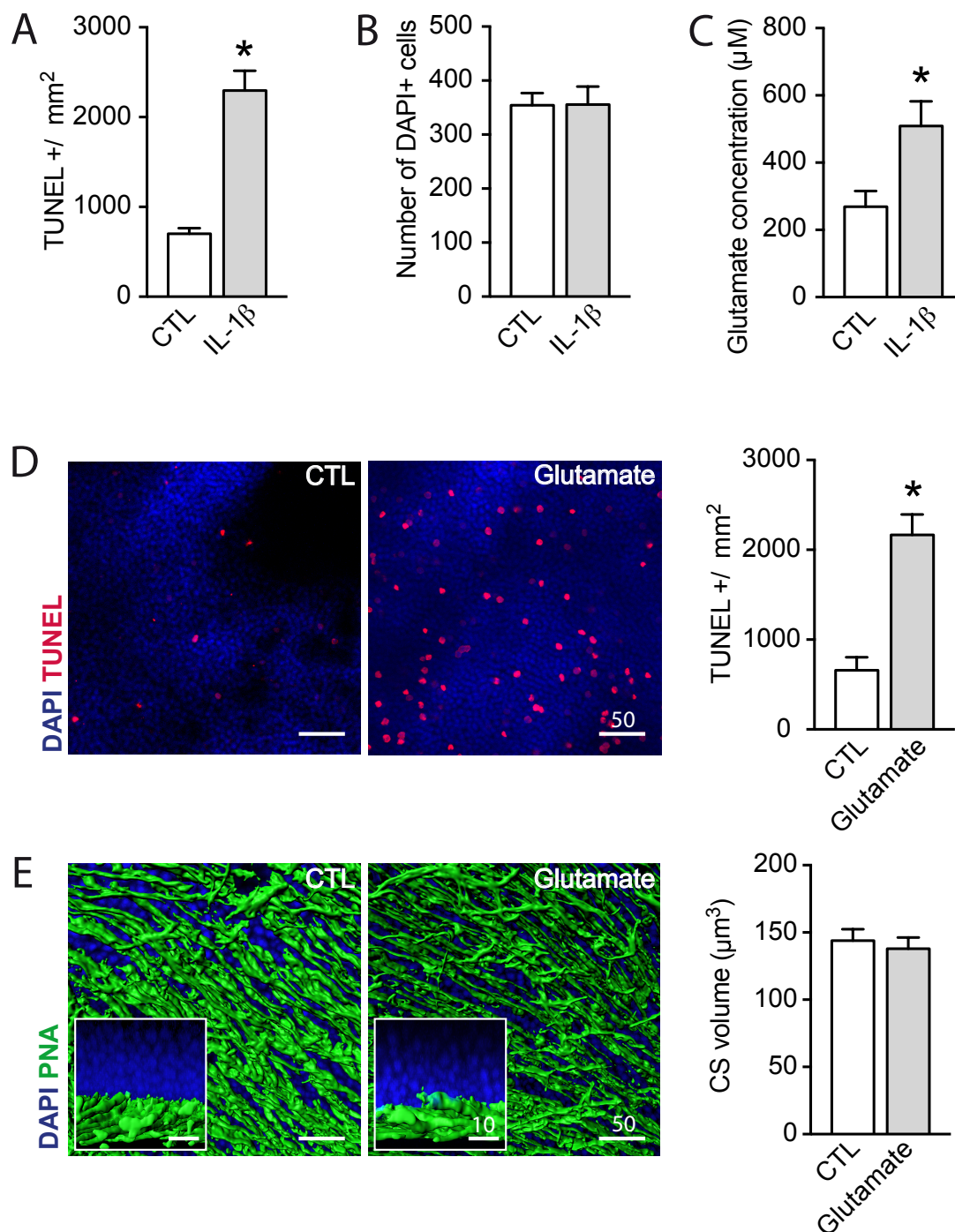


Figure 1. IL-1 β induces photoreceptor degeneration via an indirect mechanism. (A) Quantification of TUNEL⁺ nuclei in mouse retinal explants cultured with IL-1 β (n=10/group, Mann-Whitney test, *p<0.0001). (B) Quantification of the number of DAPI⁺ isolated rod photoreceptor cultured with IL-1 β (n=4/group). (C) Glutamate concentration in the supernatant of retinal explants after 18 hours of culture with IL-1 β (n=8/group, Mann-Whitney test, *p=0.0152). (D) Orthogonal projection of confocal Z stack images of the outer nuclear layer of TUNEL-(red), Hoechst nuclear dye- (blue) stained mouse retinal explants after 18 hours of culture without or with glutamate 1mM, and quantification of TUNEL⁺ nuclei (n=4/group, Mann-Whitney test, *p=0.0286). (E) Oblique and perpendicular (Inset) – 3D reconstruction of confocal Z stack images of the photoreceptor segments of mouse retinal explants after 18 hours of culture with or without glutamate 1mM, after peanut agglutinin (PNA, green) staining, and quantification of PNA+ outer segment volume (n=5/group).

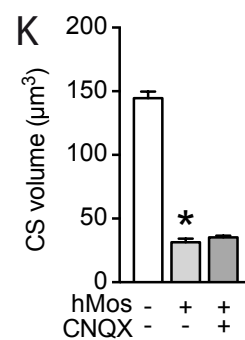
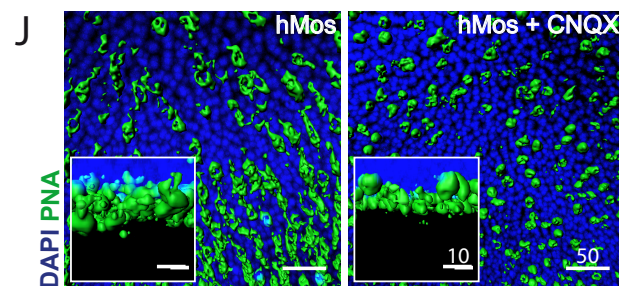
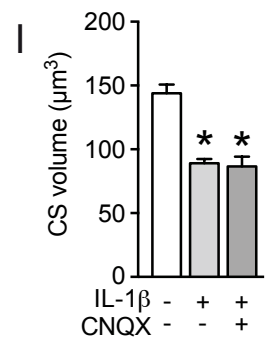
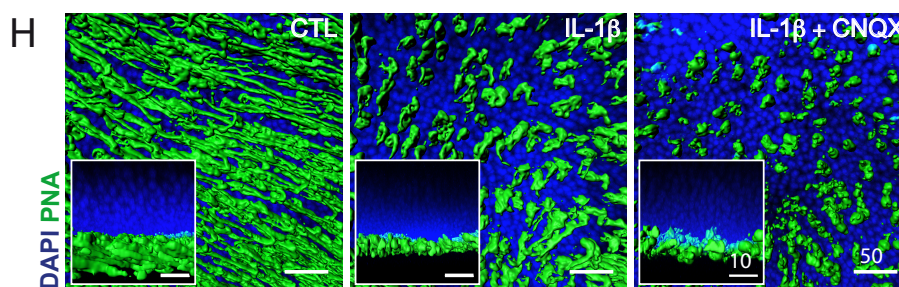
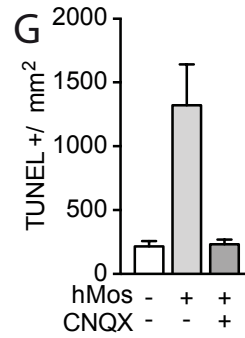
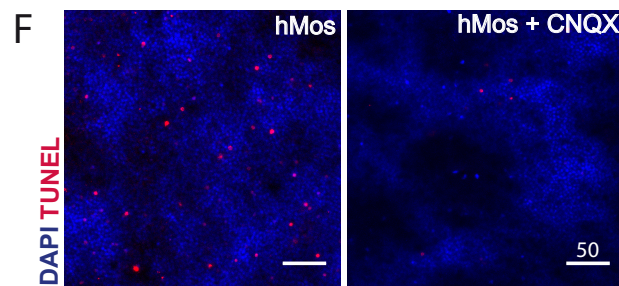
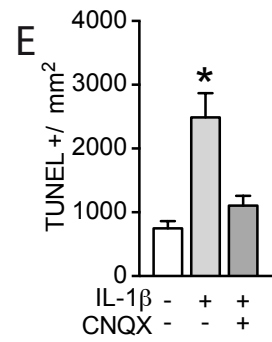
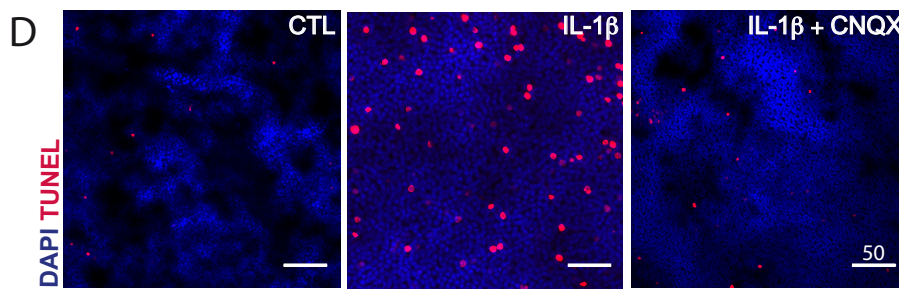
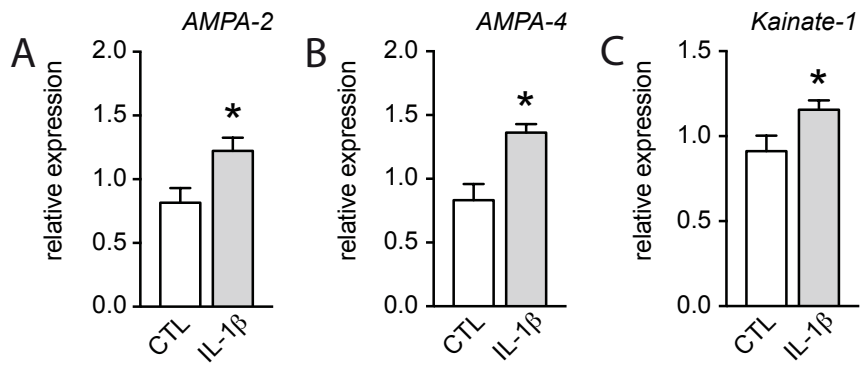


Figure 2. Glutamate is necessary to IL-1 β -mediated rod apoptosis. (A, B, C) qRT-PCR of AMPA-2, AMPA-4 and Kainate-1 normalized with S26 mRNA in total retinal explants after 18 hours of culture with IL-1 β (n=6/group, Mann-Whitney test, *p=0.0140, *p=0.0082, *p=0.0350 respectively). (D) Orthogonal projection of confocal Z stack images of the outer nuclear layer of TUNEL-(red), Hoechst nuclear dye-(blue) stained mouse retinal explants after 18 hours of culture without IL-1 β , with IL-1 β or with IL-1 β and CNQX. (E) Quantification of ONL TUNEL⁺ nuclei (n=5/group, Kruskal-Wallis, Dunn's post test, *p=0.0029). (F) Orthogonal projection of confocal Z stack images of the ONL of TUNEL-(red), Hoechst nuclear dye-(blue) stained mouse retinal explants after 18 hours of culture without hMos, with hMos or with hMos and CNQX. (G) Quantification of ONL TUNEL⁺ nuclei (n=5/group). (H) Oblique and perpendicular (Inset) – 3D reconstruction of confocal Z stack images of the photoreceptor segments of mouse retinal explants after 18 hours of culture without IL-1 β , with IL-1 β or with IL-1 β and CNQX after peanut agglutinin (PNA, green) staining. (I) Quantification of PNA⁺ outer segment volume (n=4/group, Kruskal-Wallis, Dunn's post test, *p=0.0228, *p=0.0279). (J) Oblique and perpendicular (Inset) – 3D reconstruction of confocal Z stack images of the photoreceptor segments of mouse retinal explants after 18 hours of culture without hMos, with hMos or with hMos and CNQX after peanut agglutinin (PNA, green) staining. (K) Quantification of PNA⁺ outer segment volume (n=3/group, Kruskal-Wallis, Dunn's post test, *p=0.0185).

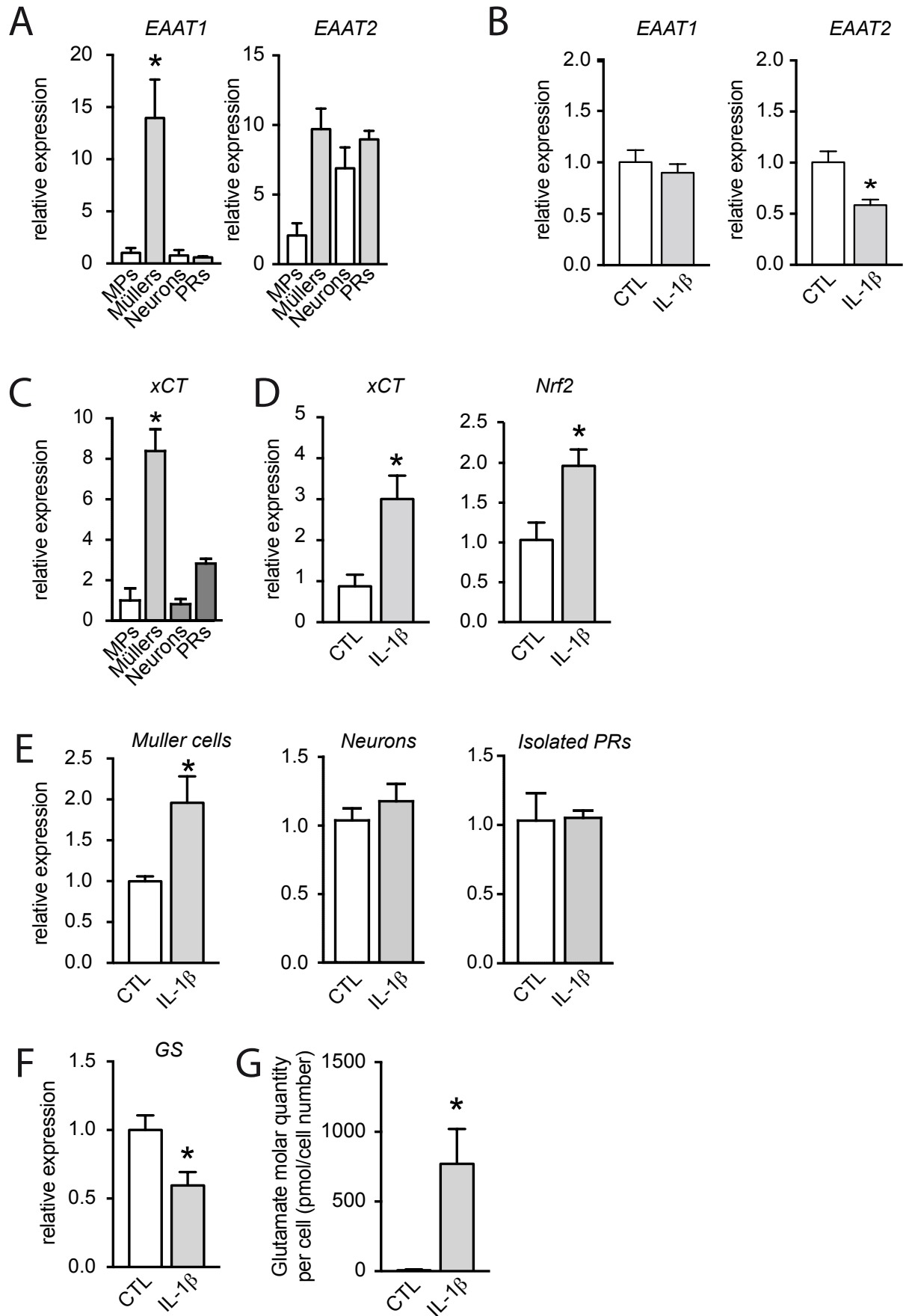


Figure 3. IL-1 β disrupts glutamate homeostatic regulation in Müller glial cells. (A) qRT-PCR of EAAT1 and EAAT2 normalized with S26 mRNA in retinal cell fractions (MPs: CD11b⁺ cells; Müller cells: CD11b-CD31-CD29⁺ cells; neurons: CD11b-CD31-CD29⁻ and PRs: photoreceptors) isolated from total retina (n=3/group, Kruskal-Wallis, Dunn's post test, *p=0.0282; n=3/group, Kruskal-Wallis, Dunn's post test, *p=0.0281). (B) qRT-PCR of EAAT1 and EAAT2 normalized with S26 mRNA in total retinal explants cultured with IL-1 β (n=5/group, Mann-Whitney test, *p=0.0282; n=5/group, Mann-Whitney test, *p=0.0173). (C) qRT-PCR of xCT normalized with S26 mRNA in retinal cell fractions (MPs: CD11b⁺ cells; Müller cells: CD11b-CD31-CD29⁺ cells; neurons: CD11b-CD31-CD29⁻ and PRs: photoreceptors) isolated from total retina (n=3/group). (D) qRT-PCR of xCT and Nrf2 normalized with S26 mRNA in total retinal explants cultured with IL-1 β (n=5/group, Mann-Whitney test, *p=0.0087; n=5/group; and *p=0.0317 respectively). (E) qRT-PCR of xCT normalized with S26 mRNA in Müller cell, neurons and photoreceptor fractions isolated from retinal explants cultured with IL-1 β (n=6/group, Mann-Whitney test, **p=0.0079). (F) qRT-PCR of GS normalized with S26 mRNA in Müller cell fraction isolated from retinal explants cultured with IL-1 β (n=6/group, Mann-Whitney test, *p=0.0152). (G) Glutamate concentration in the lysate of Müller cell fraction isolated from retinal explants cultured with IL-1 β (n=5/group, Mann-Whitney test, *p=0.0152).

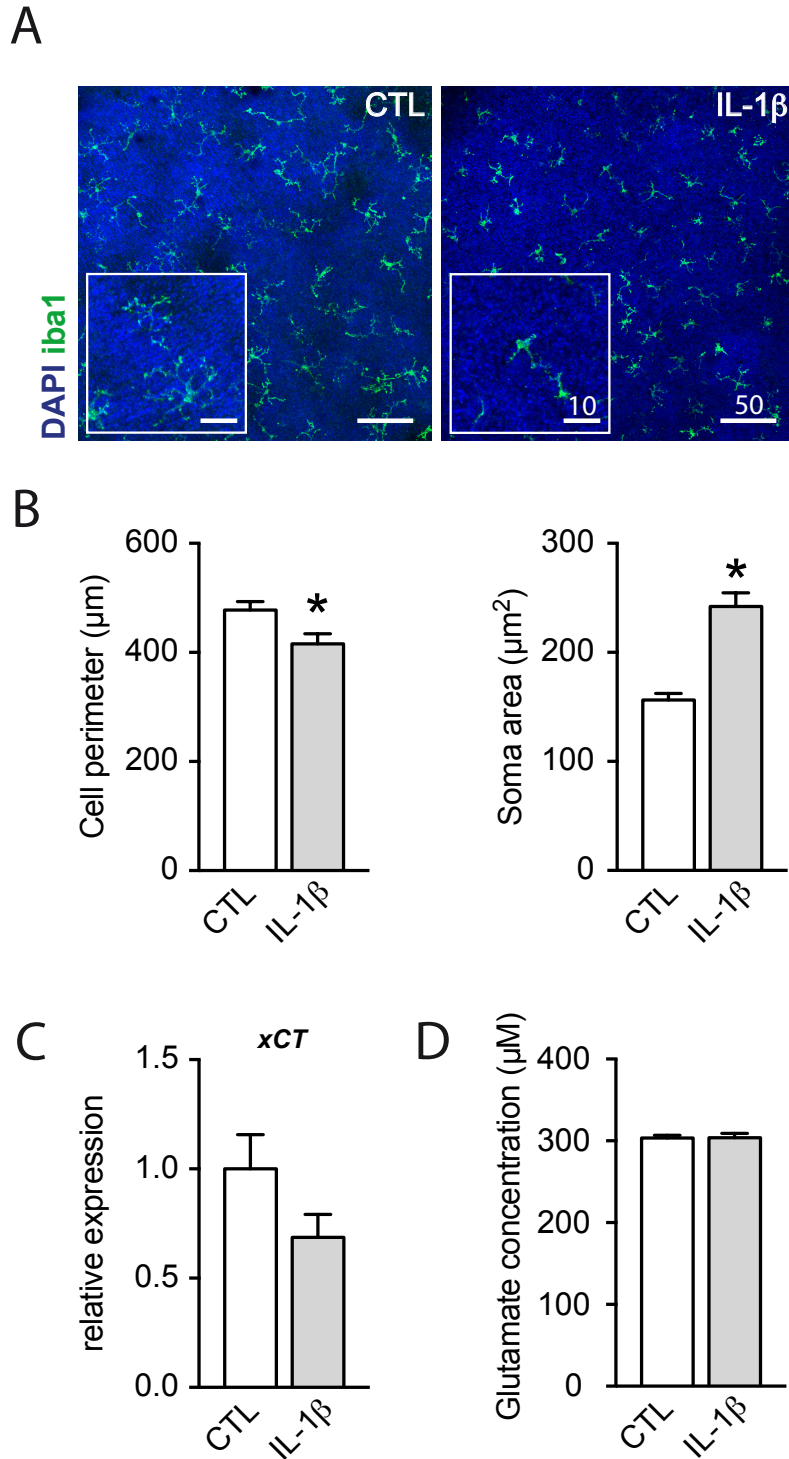


Figure 4. Microglial cells do not participate to glutamate homeostasis disruption. (A) Orthogonal projection of confocal Z stack images of the outer retinal layers of Iba1-(green), Hoechst nuclear dye-(blue) stained mouse retinal explants after 18 hours of culture without or with IL-1 β . (B) Quantification of the cell perimeter and the soma area of microglia from retinal explants cultured with IL-1 β (t test, * $p=0.0133$ and * $p<0.0001$ respectively). (C) qRT-PCR of xCT normalized with S26 mRNA in isolated microglial cells cultured with IL-1 β ($n=4$ /group, Mann-Whitney). (D) Glutamate concentration in isolated microglial cells supernatant cultured with IL-1 β ($n=4$ /group, Mann-Whitney).

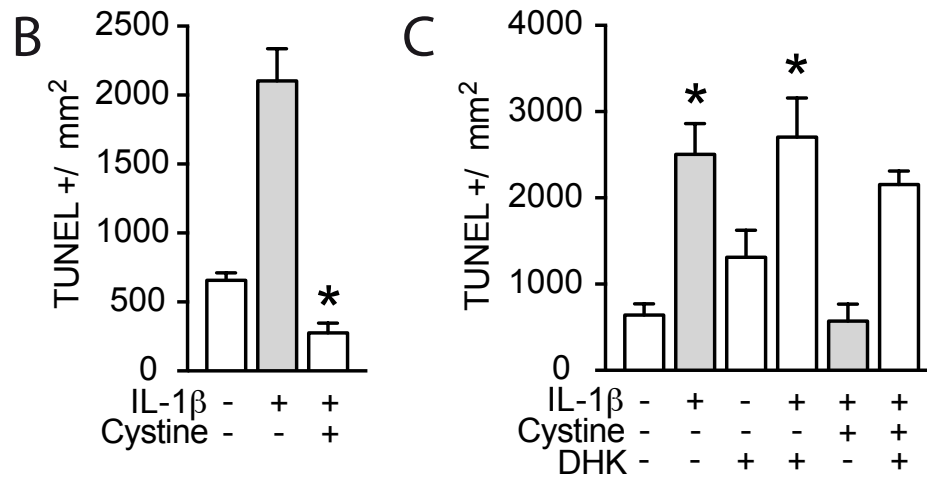
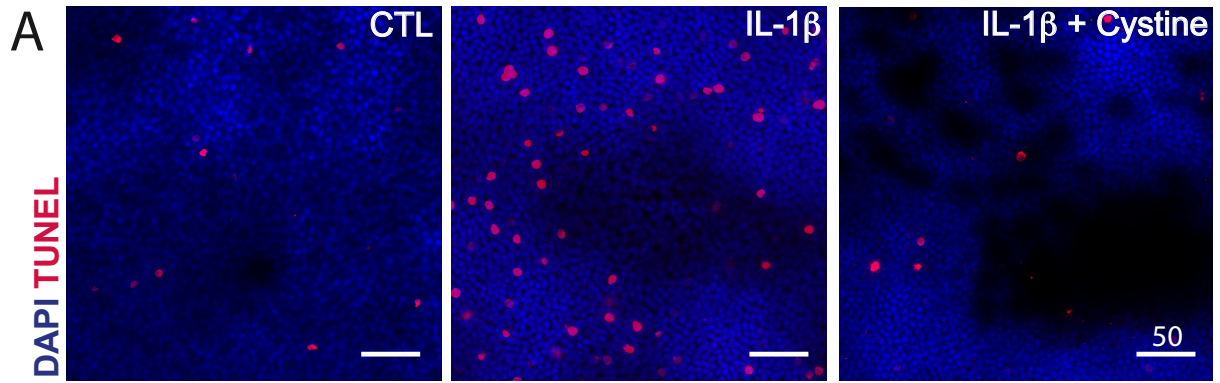


Figure 5. Cystine protects photoreceptors from IL-1 β -induced degeneration. (A) Orthogonal projection of confocal Z stack images of the outer nuclear layer of TUNEL-(red), Hoechst nuclear dye- (blue) stained mouse retinal explants after 18 hours of culture without IL-1 β , with IL-1 β or with IL-1 β and cystine. (B) Quantification of ONL TUNEL+ nuclei (n=5/group, Kruskal-Wallis, Dunn's post test, *p=0.0016). (C) Quantification of ONL TUNEL+ nuclei in mouse retinal explants after 18 hours of culture with or without IL-1 β , cystine or DHK (n=5/group, Kruskal-Wallis, Dunn's post test, *p=0.0317, *p=0.0143).

References:

Aït-Ali, N., Fridlich, R., Millet-Puel, G., Clérin, E., Delalande, F., Jaillard, C., Blond, F., Perrocheau, L., Reichman, S., Byrne, L.C., et al. (2015). Rod-derived cone viability factor promotes cone survival by stimulating aerobic glycolysis. *Cell* 161, 817–832.

Barnett, N.L., Pow, D. V, and Robinson, S.R. (2000). Inhibition of Muller cell glutamine synthetase rapidly impairs the retinal response to light. *Glia* 30, 64–73.

Cardona, A.E., Pioro, E.P., Sasse, M.E., Kostenko, V., Cardona, S.M., Dijkstra, I.M., Huang, D.R., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., et al. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat. Neurosci.* 9, 917–924.

Chen, C., Chen, H., Xu, C., Zhong, Y., and Shen, X. (2014). Role of interleukin-1 β in hypoxia-induced depression of glutamate uptake in retinal Müller cells. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 252, 51–58.

Choi, D.W., Maulucci-Gedde, M., and Kriegstein, A.R. (1987). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 7, 357–368.

Chow, A., Brown, B.D., and Merad, M. (2011). Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 788–798.

Combadière, C., Feumi, C., Raoul, W., Keller, N., Rodéro, M., Pézard, A., Lavalette, S., Houssier, M., Jonet, L., Picard, E., et al. (2007). CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J. Clin. Invest.* 117, 2920–2928.

Cooper, A.J., and Kristal, B.S. (1997). Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol. Chem.* 378, 793–802.

Cruz-Guilloty, F., Saeed, A.M., Echegaray, J.J., Duffort, S., Ballmick, A., Tan, Y., Betancourt, M., Viteri, E., Ramkhellawan, G.C., Ewald, E., et al. (2013). Infiltration of proinflammatory M1 macrophages into the outer retina precedes damage in a mouse model of age-related macular degeneration. *Int. J. Inflam.* 2013, 1–12.

- Delyfer, M.-N., Forster, V., Neveux, N., Picaud, S., Lèveillard, T., and Sahel, J.-A. (2005). Evidence for glutamate-mediated excitotoxic mechanisms during photoreceptor degeneration in the rd1 mouse retina. *Mol. Vis.* *11*, 688–696.
- Dinarello, C.A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* *117*, 3720–3732.
- Domercq, M., Sanchez-Gomez, M. V., Sherwin, C., Etxebarria, E., Fern, R., and Matute, C. (2007). System xc- and Glutamate Transporter Inhibition Mediates Microglial Toxicity to Oligodendrocytes. *J. Immunol.* *178*, 6549–6556.
- Eandi, C.M., Messance, H.C., Augustin, S., Dominguez, E., Lavalette, S., Forster, V., Hu, S.J., Siquieros, L., Craft, C.M., Sahel, J.A., et al. (2016). Subretinal mononuclear phagocytes induce cone segment loss via IL-1 β . *Elife* *5*.
- Fletcher, E.L., Hack, I., Brandstätter, J.H., and Wässle, H. (2000). Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. *J. Comp. Neurol.* *420*, 98–112.
- Fogal, B., Li, J., Lobner, D., McCullough, L.D., and Hewett, S.J. (2007). System xc Activity and Astrocytes Are Necessary for Interleukin-1 -Mediated Hypoxic Neuronal Injury. *J. Neurosci.* *27*, 10094–10105.
- Grosche, A., Hauser, A., Lepper, M.F., Mayo, R., von Toerne, C., Merl-Pham, J., and Hauck, S.M. (2016). The Proteome of Native Adult Müller Glial Cells From Murine Retina. *Mol. Cell. Proteomics* *15*, 462–480.
- Guillonneau, X., Eandi, C.M., Paques, M., Sahel, J.A., Sapiéha, P., and Sennlaub, F. (2017). On phagocytes and macular degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* *61*, 98–128.
- Guo, C., Otani, A., Oishi, A., Kojima, H., Makiyama, Y., Nakagawa, S., and Yoshimura, N. (2012). Knockout of *ccr2* alleviates photoreceptor cell death in a model of retinitis pigmentosa. *Exp. Eye Res.* *104*, 39–47.
- Gupta, N., Brown, K.E., and Milam, A.H. (2003). Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* *76*, 463–471.

Harada, T., Harada, C., Watanabe, M., Inoue, Y., Sakagawa, T., Nakayama, N., Sasaki, S., Okuyama, S., Watase, K., Wada, K., et al. (1998). Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 4663–4666.

Harvey, D.M., and Calkins, D.J. (2002). Localization of kainate receptors to the presynaptic active zone of the rod photoreceptor in primate retina. *Vis. Neurosci.* *19*, 681–692.

Haumann, I., Junghans, D., Anstötz, M., and Frotscher, M. (2017). Presynaptic localization of GluK5 in rod photoreceptors suggests a novel function of high affinity glutamate receptors in the mammalian retina. *PLoS One* *12*, e0172967.

Hu, S.J., Calippe, B., Lavalette, S., Roubexis, C., Montassar, F., Housset, M., Levy, O., Delarasse, C., Paques, M., Sahel, J.A., et al. (2015). Upregulation of P2RX7 in Cx3cr1-deficient mononuclear phagocytes leads to increased interleukin-1 β secretion and photoreceptor neurodegeneration. *J. Neurosci.* *35*, 6987–6996.

Huang, Y., Smith, D.E., Ibanez-Sandoval, O., Sims, J.E., and Friedman, W.J. (2011). Neuron-Specific Effects of Interleukin-1 Are Mediated by a Novel Isoform of the IL-1 Receptor Accessory Protein. *J. Neurosci.* *31*, 18048–18059.

Jackman, N.A., Uliasz, T.F., Hewett, J.A., and Hewett, S.J. (2010). Regulation of system xc⁻ activity and expression in astrocytes by interleukin-1 beta: Implications for hypoxic neuronal injury. *Glia* *58*, 1806–1815.

Jakobs, T.C., Ben, Y., and Masland, R.H. (2007). Expression of mRNA for glutamate receptor subunits distinguishes the major classes of retinal neurons, but is less specific for individual cell types. *Mol. Vis.* *13*, 933–948.

Kigerl, K.A., Ankeny, D.P., Garg, S.K., Wei, P., Guan, Z., Lai, W., McTigue, D.M., Banerjee, R., and Popovich, P.G. (2012). System x(c)⁻ regulates microglia and macrophage glutamate excitotoxicity in vivo. *Exp. Neurol.* *233*, 333–341.

Klein, R., Peto, T., Bird, A., and Vannewkirk, M.R. (2004). The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* *137*, 486–495.

Kohno, H., Chen, Y., Kevany, B.M., Pearlman, E., Miyagi, M., Maeda, T., Palczewski, K., and Maeda, A. (2013). Photoreceptor proteins initiate microglial activation via toll-like receptor 4 in retinal degeneration mediated by all-trans-retinal. *J. Biol. Chem.* *288*, 15326–15341.

Koprach, J.B., Reske-Nielsen, C., Mithal, P., and Isacson, O. (2008). Neuroinflammation mediated by IL-1 β increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *J. Neuroinflammation* *5*, 8.

Lewerenz, J., Hewett, S.J., Huang, Y., Lambros, M., Gout, P.W., Kalivas, P.W., Massie, A., Smolders, I., Methner, A., Pergande, M., et al. (2013). The Cystine/Glutamate Antiporter System x_c⁻ in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Novel Therapeutic Opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* *18*, 522–555.

Liu, S.J., and Zukin, R.S. (2007). Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends Neurosci.* *30*, 126–134.

Liu, X., Albano, R., and Lobner, D. (2014). FGF-2 induces neuronal death through upregulation of system x_c⁻. *Brain Res.* *1547*, 25–33.

Matott, M.P., Kline, D.D., and Hasser, E.M. (2017). Glial EAAT2 regulation of extracellular nTS glutamate critically controls neuronal activity and cardiorespiratory reflexes. *J. Physiol.* *595*, 6045–6063.

Murphy, T.H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R.L., and Coyle, J.T. (1989). Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* *2*, 1547–1558.

Mysona, B., Dun, Y., Duplantier, J., Ganapathy, V., and Smith, S.B. (2009). Effects of hyperglycemia and oxidative stress on the glutamate transporters GLAST and system x_c⁻ in mouse retinal Müller glial cells. *Cell Tissue Res.* *335*, 477–488.

Niklaus, S., Cadetti, L., vom Berg-Maurer, C.M., Lehnerr, A., Hotz, A.L., Forster, I.C., Gesemann, M., and Neuhauss, S.C.F. (2017). Shaping of Signal Transmission at the Photoreceptor Synapse by EAAT2 Glutamate Transporters. *Eneuro* *4*, ENEURO.0339-16.2017.

Prow, N.A., and Irani, D.N. (2008). The Inflammatory Cytokine, Interleukin-1 Beta, Mediates Loss of Astroglial Glutamate Transport and Drives Excitotoxic Motor Neuron Injury in the Spinal Cord During Acute Viral Encephalomyelitis. *J. Neurochem.* *105*, 1276.

Punzo, C., Kornacker, K., and Cepko, C.L. (2009). Stimulation of the insulin/mTOR pathway delays cone death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Nat. Neurosci.* *12*, 44–52.

Rutar, M., Natoli, R., and Provis, J.M. (2012). Small interfering RNA-mediated suppression of Ccl2 in Müller cells attenuates microglial recruitment and photoreceptor death following retinal degeneration. *J. Neuroinflammation* *9*, 221.

Sarks, J.P., Sarks, S.H., and Killingsworth, M.C. (1988). Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium. *Eye* *2*, 552–577.
Schroder, K., and Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell* *140*, 821–832.

Scuderi, S., D'amico, A.G., Federico, C., Saccone, S., Magro, G., Bucolo, C., Drago, F., and D'Agata, V. (2015). Different Retinal Expression Patterns of IL-1 α , IL-1 β , and Their Receptors in a Rat Model of Type 1 STZ-Induced Diabetes. *J. Mol. Neurosci.* *56*, 431–439.

Sennlaub, F., Auvynet, C., Calippe, B., Lavalette, S., Poupel, L., Hu, S.J., Dominguez, E., Camelo, S., Levy, O., Guyon, E., et al. (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*, 1775–1793.

Shaftel, S.S., Griffin, W.S.T., and Kerry, K.M. (2008). The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: An evolving perspective. *J. Neuroinflammation* *5*, 7.

Shi, J., He, Y., Hewett, S.J., and Hewett, J.A. (2016). Interleukin 1 β Regulation of the System xc- Substrate-specific Subunit, xCT, in Primary Mouse Astrocytes Involves the RNA-binding Protein HuR. *J. Biol. Chem.* *291*, 1643–1651.

Shih, A.Y., Erb, H., Sun, X., Toda, S., Kalivas, P.W., and Murphy, T.H. (2006). Cystine/Glutamate Exchange Modulates Glutathione Supply for Neuroprotection from Oxidative Stress and Cell Proliferation. *J. Neurosci.* *26*, 10514–10523.

Tse, D.Y., Chung, I., and Wu, S.M. (2014). Pharmacological inhibitions of glutamate transporters EAAT1 and EAAT2 compromise glutamate transport in photoreceptor to ON-bipolar cell synapses. *Vision Res.* *103*, 49–62.

Ye, L., Huang, Y., Zhao, L., Li, Y., Sun, L., Zhou, Y., Qian, G., and Zheng, J.C. (2013). IL-1 β and TNF- α induce neurotoxicity through glutamate production: a potential role for neuronal glutaminase. *J. Neurochem.* *125*, 897–908.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

1) Résumé des résultats de la thèse

Les travaux présentés ci-dessus démontrent l'accumulation de phagocytes mononucléés dans l'espace sous-rétinien de patients atteints de DMLA atrophique, au niveau de la zone atrophique, et de la zone de transition qui la borde. Nous montrons que la présence de macrophages est associée à la dégénérescence des photorécepteurs, caractérisée par l'apoptose des bâtonnets, et la perte des segments de cônes. Les macrophages induisent un phénotype similaire *in vivo* et *ex vivo*, et nos résultats montrent qu'IL-1 β est nécessaire à l'induction de la dégénérescence des photorécepteurs par les macrophages. Nos résultats montrent aussi qu'IL-1 β induit indirectement l'apoptose des bâtonnets, et crée une perturbation de l'homéostasie rétinienne du glutamate, traduite par l'augmentation de la concentration extracellulaire en glutamate. Nous montrons que CNQX - un inhibiteur des récepteurs glutamatergiques de type non-NMDA - permet de prévenir la perte des bâtonnets induite par IL-1 β , établissant l'existence d'un mécanisme excitotoxique induit par le glutamate. Enfin, nous montrons que l'apport exogène en cystine suffit à favoriser la survie des photorécepteurs en dépit de l'effet induit par IL-1 β , probablement en rétablissant le fonctionnement du métabolisme antioxydant.

2) Considérations générales sur la persistance sous-rétinienne des macrophages

Nous allons voir comment ces phagocytes mononucléés sont recrutés, et quels facteurs peuvent modifier leur survie dans l'espace sous-rétinien, favorisant leur accumulation chronique.

Dès le stade précoce de la DMLA - maculopathie liée à l'âge (MLA) - les phagocytes mononucléés s'accumulent en grand nombre au niveau des drusens sous-rétiens (Levy et al., 2015a) le long de l'épithélium pigmentaire (EPR). Cette observation suggère que la MLA est associée à un dysfonctionnement du potentiel immunosuppresseur de l'EPR, prévenant l'élimination de ces phagocytes. Il est difficile de déterminer si c'est la perte de fonction de l'EPR qui permet l'accumulation de macrophages, mais il apparaît que la persistance de l'inflammation sous-rétinienne associée à la présence de phagocytes mononucléés est liée à la progression de la maladie vers l'atrophie géographique. L'inhibition du recrutement CCR2-dépendant des macrophages (Guo et al., 2012) ou l'atténuation pharmacologique des monocytes (Kohno et al., 2013) diminuent la dégénérescence rétinienne, montrant clairement l'importance des macrophages inflammatoires dans la dégénérescence des photorécepteurs. Ces résultats sont confortés par l'étude de Sennlaub et al, montrant que l'inhibition de l'axe CCL2/CCR2 atténue l'inflammation sous-rétinienne chez la souris déficiente en Cx3cr1, réduisant la dégénérescence des photorécepteurs (Sennlaub et al., 2013).

2.1) Les polymorphismes génétiques

Ces résultats ne justifient pas la persistance de l'inflammation sous-rétinienne, mais comme nous l'avons développé dans l'introduction, l'association entre certains polymorphismes génétiques – comme CFH ou APOE - et la prévalence de développer une des formes tardives de la DMLA pourrait permettre d'éclaircir certains mécanismes. En effet, certains travaux publiés par notre équipe ont permis de montrer comment la liaison de CFH au récepteur CD11b/CD18 interfère avec l'interaction TSP-1/CD47 - qui favorise normalement l'élimination des macrophages (Calippe et al., 2017). D'autres données non publiées montrent que CD47 et TSP-1 sont essentiels à la potentialisation de l'élimination des macrophages par le système Fas/FasL. Ainsi, l'utilisation d'un agoniste du récepteur CD47 pourrait permettre de restaurer l'effet immunosuppresseur de l'EPR chez les patients atteints de DMLA. De plus, d'autres travaux ont montré l'association entre la surexpression d'APOE et IL-6 dans l'inflammation sous-rétinienne, induisant une diminution de l'expression de FasL par les cellules de l'EPR (Levy et al., 2015a). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'IL-6 pourrait permettre d'inhiber cet effet chez les patients atrophiques, et là encore rétablir l'effet immunosuppresseur de l'EPR.

2.2) Exposition à la lumière

L'exposition à la lumière est un protocole couramment utilisé dans notre équipe pour induire l'inflammation sous-rétinienne - chez la souris déficiente en Cx3cr1 le plus souvent. Quand ces souris sont soumises à un cycle jour/nuit classique en animalerie (250 lux lorsque les lumières sont allumées) tout au long du vieillissement, les macrophages s'accumulent dans l'espace sous-rétinien avec l'âge : mais lorsqu'elles sont maintenues à l'obscurité, on n'observe pas de telle accumulation (Combadière et al., 2007). Ce résultat montre que l'accumulation de macrophages est dépendante de l'exposition à la lumière. Un modèle de challenge lumineux a donc été développé, afin d'induire l'inflammation sous-rétinienne plus rapidement chez de jeunes souris, en soumettant les animaux pendant 4 jours à une intensité lumineuse de 4500 lux. Là encore, on observe une forte accumulation sous-rétinienne de phagocytes mononucléés, alors que ce n'est pas le cas chez les souris WT (Sennlaub et al., 2013). Lorsque des animaux déficients en FasL, TSP-1 ou CD47 – c'est-à-dire des facteurs impliqués dans la résolution de l'inflammation - sont soumis au même challenge lumineux, on observe une forte accumulation de macrophages inflammatoires (Calippe et al., 2017; Levy et al., 2015a) : ce résultat suggère que les souris WT exposées à la lumière ne présentent pas d'inflammation sous-rétinienne car les macrophages sont efficacement éliminés au fur et à mesure, et non pas parce qu'ils ne sont pas recrutés.

On peut ainsi imaginer qu'un patient humain présentant certains facteurs de risque, comme l'âge et une prédisposition génétique entravant la résolution de l'inflammation, pourrait développer une inflammation sous-rétinienne importante et chronique après

une exposition prolongée à des fortes intensités lumineuses. A l'heure actuelle, aucun lien mécanistique n'a été clairement établi entre la lumière et l'activation des macrophages, mais on peut supposer l'induction de stress photo-oxydatif dans les segments externes des photorécepteurs, favorisant le recrutement des monocytes et/ou la diminution de l'effet immunosuppresseur de l'EPR.

2.3) Stress oxydant

Certains travaux ont mis en évidence un lien entre l'apport massif de stress oxydant dû à la fumée du tabac, et une diminution de l'expression du facteur de transcription Nrf2 au niveau de l'EPR, ce qui pourrait affecter sa capacité à lutter contre le stress oxydant (Cano et al., 2010; Datta et al., 2017). L'exposition chronique à la fumée de cigarette est aussi connue pour être un facteur aggravant dans de nombreuses pathologies inflammatoires ou certaines pathologies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde (Vessey et al., 1987). La consommation de tabac pourrait ainsi participer indirectement à l'accumulation sous-rétinienne de macrophages, et favoriser le développement de la DMLA, mais aucun mécanisme reliant ces deux phénomènes n'a encore été clairement établi.

2.4) Obésité & inflammation systémique

Chez les patients obèses, les macrophages sont présents dans un état activé, et on mesure au niveau des tissus adipeux et du sang circulant une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires (Park et al., 2005). Or, plusieurs études montrent que l'insulino-résistance et le développement du diabète de type 2 peuvent être induits par la production d'IL-1 β (Jager et al., 2007), d'IL-6 (Vozarova et al., 2001), de TNF- α (Hotamisligil et al., 1993) et de CCL2 (Kawano et al., 2016). Ces résultats suggèrent que le comportement alimentaire a un effet particulièrement fort sur la polarisation des macrophages, et favorise leur activation tout en les maintenant dans un état pro-inflammatoire. En plus d'avoir un impact systémique, l'alimentation joue aussi un rôle sur la composition du microbiote intestinal, que l'on sait impacter fortement le fonctionnement du système immunitaire (Sommer and Bäckhed, 2013). Une étude publiée en 2016 a montré que des souris soumises à un régime riche en graisses présentent des perturbations de la composition de leur microbiote intestinal, favorisant le développement de lésions néo-vasculaires associées à la DMLA dans un modèle induit par photo-coagulation laser (Andriessen et al., 2016). Andriessen et al établissent ainsi que l'induction de la dysbiose déclencherait une inflammation systémique en augmentant la perméabilité intestinale aux PAMPs (Andriessen et al., 2016).

En conclusion le surpoids, et plus généralement le comportement alimentaire, ont un impact profond sur l'excitabilité des macrophages, et pourraient effectivement contribuer à l'augmentation du risque de développer la DMLA même si là encore aucun

lien direct n'a été établi.

3) Perspectives thérapeutiques

Actuellement, il n'existe pas de traitement pour soigner ou ralentir la progression de l'atrophie géographique. Comme nous l'avons vu, les raisons pour lesquelles les phagocytes mononucléés peuvent s'accumuler dans l'espace sous-rétinien sont variables, et il est difficile de développer une thérapie qui les cible efficacement. Notre travail a donc consisté à identifier les mécanismes de toxicité induits par les macrophages, afin de lutter contre leurs effets. Nous présentons ci-dessous quelques pistes envisageables.

3.1) Inhibition des récepteurs au glutamate

Nous avons montré que l'IL-1 β induit une libération excessive de glutamate dans le milieu extracellulaire rétinien, entraînant la mort des bâtonnets via un mécanisme excitotoxique impliquant les récepteurs AMPA/Kainate. On pourrait donc envisager d'utiliser des inhibiteurs spécifiques de ces récepteurs, afin de prévenir la dégénérescence des bâtonnets.

De nombreuses études ont précédemment été conduites dans l'objectif d'inhiber les récepteurs glutamatergiques et favoriser la neuro-protection. Malheureusement, nombre d'entre elles visaient les récepteurs de type NMDA (Lai et al., 2014), ce qui ne serait probablement pas efficace dans notre modèle étant donné que les récepteurs NMDA ne sont à notre connaissance pas ou peu exprimés par les photorécepteurs.

On sait que la sur-stimulation des récepteurs non-NMDA entraîne un fort influx de Ca²⁺ qui induit secondairement la mort neuronale. Le topiramate est un médicament antiépileptique utilisé pour diminuer l'excitabilité neuronale et favoriser la neuroprotection, en réduisant l'influx de Ca²⁺ induit par la stimulation des récepteurs AMPA/Kainate (Poulsen et al., 2004). Ce médicament pourrait donc présenter une perspective thérapeutique intéressante : en effet, le glutamate est le neurotransmetteur excitateur rétinien majeur, et inhiber totalement ses récepteurs rendrait probablement les patients aveugles. Il est préférable d'envisager une approche similaire à celle du topiramate, réduisant l'excitabilité des neurones, sans totalement l'inhiber.

Enfin, d'autres approches plus générales ont été développées, par exemple via l'utilisation du fingolimod (FTY720), un modulateur des récepteurs de la sphingosine-1-phosphate utilisé dans la sclérose en plaque. Le fingolimod exerce un effet neuroprotecteur anti-excitotoxique de manière indirecte, en régulant négativement la neuro-inflammation induite par les macrophages (Cipriani et al., 2015).

3.2) Inhibition du système x_c^-

Nous avons montré que l'IL-1 β induit une surexpression du système x_c^- dans les cellules gliales de Müller, associée à la libération accrue de glutamate. On pourrait donc envisager l'inhibition de cet anti-porteur, afin de prévenir en partie l'accumulation extracellulaire de glutamate.

Dans le gliome, l'expression du système x_c^- est augmentée, alors que celle des transporteurs au glutamate comme EAAT2 est compromise. En conséquence, le glutamate libéré par les gliomes s'accumule dans le milieu extracellulaire, et induit la mort par excitotoxicité des neurones environnants. Ces conditions fournissent un environnement idéal au développement des cellules du gliome, qui se répandent alors plus facilement (Ye et al., 1999). Ces découvertes ont stimulé la recherche d'inhibiteurs spécifiques du système x_c^- , et conduit à la découverte de deux agents pharmacologiques : la (S)-4-carboxyphenylglycine (S-4CPG) (Ye and Sontheimer, 1999), et la sulfasalazine (Gout et al., 2001). L'inconvénient de la S-4CPG est qu'elle n'est pas exclusivement spécifique du système x_c^- , et inhibe les récepteurs métabotropiques du groupe I (Doherty et al., 1999). La sulfasalazine présente l'intérêt d'avoir déjà été approuvée par le FDA dans le traitement de pathologies intestinales inflammatoires comme la maladie de Crohn. Cependant, la prise de sulfasalazine n'est autorisée que par voie orale, et celle-ci est métabolisée dans l'intestin par les azoréductases, ce qui la rend inefficace pour inhiber le système x_c^- après avoir rejoint la circulation sanguine (Azadkhan et al., 1982). Si elle était autorisée, l'injection intra-vitréenne de sulfasalazine pourrait peut-être s'avérer efficace, ou l'utilisation d'autres analogues pourrait être envisagée (Shukla et al., 2011).

Mais il faut être prudent, car la régulation de l'équilibre homéostatique d'un tissu tumoral ne peut pas être transposée *stricto sensu* à celle de la rétine fonctionnelle, et comme nous l'avons vu, il est très compliqué de manipuler les équilibres du glutamate au sein de la rétine. Le système x_c^- est un anti-porteur essentiel pour fournir les cellules en cystine (Mysona et al., 2009), un acide aminé requis pour la synthèse du glutathion antioxydant (Cooper and Kristal, 1997). Ainsi, selon le contexte, le système x_c^- semble exercer des effets ambivalents sur la survie neuronale. Dans certains modèles, son inhibition a été associée à l'accumulation de stress oxydant – résultant du défaut dans la synthèse de glutathion – et à la mort neuronale (Murphy et al., 1989b; Shih et al., 2006). Dans d'autres modèles, l'accroissement de l'activité du système x_c^- a été associée à l'apoptose neuronale (Domercq et al., 2007; Fogal et al., 2007; Liu et al., 2014).

Nous prévoyons donc d'explorer l'effet de l'inhibition du système x_c^- dans notre modèle d'explants rétinien, cultivés en présence d'IL-1 β .

3.3) Inhibition du stress oxydant induit par l'excitotoxicité

Nous avons montré que l'apport exogène de cystine permet de réduire l'apoptose des bâtonnets induite par l'IL-1 β . Ce résultat suggère que l'augmentation de la concentration extracellulaire en cystine permet de faire à nouveau fonctionner le système x_c^- exprimé par les photorécepteurs, en contrebalançant son inhibition induite par la forte concentration extracellulaire en glutamate. On peut penser que fournir les bâtonnets en cystine permet de remettre en marche la machinerie antioxydante, favorisant leur survie dans un environnement excitotoxique.

Les photorécepteurs sont particulièrement sensibles aux stress oxydatif de par leur consommation importante d'oxygène. Nous prévoyons donc d'exploiter cette piste en utilisant des inhibiteurs spécifiques permettant de contrôler l'accumulation de stress oxydant induite par l'excitotoxicité. De toutes les cibles potentielles, le peroxy-nitrite présente un intérêt particulier car contrairement aux ROS, il ne présente pas de fonction physiologique reconnue (Pacher et al., 2007). La production de peroxy-nitrite résulte de l'interaction entre l'oxyde nitrique et le superoxyde, et induit des dommages à l'ADN et aux mitochondries, ainsi que la déplétion des réserves antioxydantes (Beckman, 1996). Afin de contrer son effet, nous envisageons l'utilisation du sodium disulfenton (NXY-059, ou Cerovive), un composé capable d'éliminer très efficacement le peroxy-nitrite, et qui a déjà montré son efficacité en tests cliniques (Lees et al., 2006). L'utilisation d'acide urique pourrait aussi être envisagée : ce composé prévient la mort cellulaire induite par le glutamate (Yu et al., 1998), et supprime les dommages induits par les ROS ou le peroxy-nitrite (Squadrito et al., 2000). De même, l'edaravone, une drogue anti-oxydante éliminant les résidus hydroxyl et peroxy ainsi que les radicaux superoxydes, a déjà montré sa capacité à inhiber les mécanismes pathologiques associés à l'inflammation chronique (Lapchak, 2010), et son utilisation pourrait être envisagée dans des modèles d'inflammation sous-rétinienne.

3.4) Mode d'application

La rétine est un tissu nerveux qui présente l'avantage d'être relativement accessible. L'injection intra-vitréenne permet d'injecter localement directement dans le vitré, en traversant la sclère au niveau de l'ora serrata. Cette technique est couramment utilisée - dans le traitement de la DMLA exsudative par exemple, avec l'injection d'anticorps anti-VEGF inhibant la néo-vascularisation. Ce mode d'injection est relativement bien toléré chez les patients, et présente peu de complications graves, ce qui en rend possible la pratique jusqu'à une fréquence d'une injection par mois. De plus, la présence de la barrière hémato-rétinienne permet d'éviter la diffusion dans la circulation systémique de protéines ayant un poids moléculaire supérieur à 30kDa.

Mais la découverte d'un médicament à application topique, c'est-à-dire qui pourrait être appliqué sur la surface de l'œil au niveau de la conjonctive, serait un progrès remarquable pour la qualité de vie des patients. Il a été montré que l'application topique

de peptides inhibiteurs de calpaïnes permet de prévenir la dégénérescence des photorécepteurs dans certains modèles (Ozaki et al., 2012). Ainsi, un antioxydant pourrait être un très bon candidat pour ce type d'approche.

BIBLIOGRAPHIE

- Ach, T., Huisinigh, C., McGwin, G., Messinger, J.D., Zhang, T., Bentley, M.J., Gutierrez, D.B., Ablonczy, Z., Smith, R.T., Sloan, K.R., et al. (2014). Quantitative Autofluorescence and Cell Density Maps of the Human Retinal Pigment Epithelium. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* *55*, 4832.
- Adams, M.K.M., Simpson, J.A., Aung, K.Z., Makeyeva, G.A., Giles, G.G., English, D.R., Hopper, J., Guymer, R.H., Baird, P.N., and Robman, L.D. (2011). Abdominal Obesity and Age-related Macular Degeneration. *Am. J. Epidemiol.* *173*, 1246–1255.
- Agarwal, A., Rhoades, W.R., Hanout, M., Soliman, M.K., Sarwar, S., Sadiq, M.A., Sepah, Y.J., Do, D. V., and Nguyen, Q.D. (2015). Management of neovascular age-related macular degeneration: Current state-of-the-art care for optimizing visual outcomes and therapies in development. *Clin. Ophthalmol.* *9*, 1001–1015.
- Allen, S.J., Watson, J.J., Shoemark, D.K., Barua, N.U., and Patel, N.K. (2013). GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol. Ther.* *138*, 155–175.
- Anderson, D.H., Ozaki, S., Nealon, M., Neitz, J., Mullins, R.F., Hageman, G.S., and Johnson, L. V (2001). Local cellular sources of apolipoprotein E in the human retina and retinal pigmented epithelium: Implications for the process of drusen formation. *Am. J. Ophthalmol.* *131*, 767–781.
- Anderson, D.H., Radeke, M.J., Gallo, N.B., Chapin, E.A., Johnson, P.T., Curletti, C.R., Hancox, L.S., Hu, J., Ebright, J.N., Malek, G., et al. (2010). The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: Hypothesis re-visited. *Prog. Retin. Eye Res.* *29*, 95–112.
- Andriessen, E.M., Wilson, A.M., Mawambo, G., Dejda, A., Miloudi, K., Sennlaub, F., and Sapiéha, P. (2016). Gut microbiota influences pathological angiogenesis in obesity-driven choroidal neovascularization. *EMBO Mol. Med.* *8*, 1366–1379.
- Annunziato, L., Amoroso, S., Pannaccione, A., Cataldi, M., Pignataro, G., D'Alessio, A., Sirabella, R., Secondo, A., Sibaud, L., and Di Renzo, G.F. (2003). Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: Role played by caspases and intracellular calcium ions. In *Toxicology Letters*, pp. 125–133.
- Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P., and Amara, S.G. (1997). Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 4155–4160.
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science (80-.)*. *317*, 666–670.
- Azadkhan, A., Truelove, S., and Aronson, J. (1982). The disposition and metabolism of sulphasalazine (salicylazosulphapyridine) in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* *13*, 523–528.

- Bailey, T.A., Kanuga, N., Romero, I.A., Greenwood, J., Luthert, P.J., and Cheetham, M.E. (2004). Oxidative stress affects the junctional integrity of retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *45*, 675–684.
- Baka, S., Clamp, A.R., and Jayson, G.C. (2006). A review of the latest clinical compounds to inhibit VEGF in pathological angiogenesis. *Expert Opin. Ther. Targets* *10*, 867–876.
- Baker, D.A., McFarland, K., Lake, R.W., Shen, H., Tang, X.C., Toda, S., and Kalivas, P.W. (2003). Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. *Nat. Neurosci.* *6*, 743–749.
- Balasubramanian, R., and Gan, L. (2014). Development of Retinal Amacrine Cells and Their Dendritic Stratification. *Curr. Ophthalmol. Rep.* *2*, 100–106.
- Bamforth, S.D., Lightman, S., and Greenwood, J. (1996). The effect of TNF-alpha and IL-6 on the permeability of the rat blood-retinal barrier in vivo. *Acta Neuropathol.* *91*, 624–632.
- Ban, Y., and Rizzolo, L.J. (2000). Differential regulation of tight junction permeability during development of the retinal pigment epithelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *279*, C744–C750.
- Bannai, S. (1986). Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *261*, 2256–2263.
- Barde, Y.A., Edgar, D., and Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* *1*, 549–553.
- Barnett, N.L., Pow, D. V, and Bull, N.D. (2001). Differential perturbation of neuronal and glial glutamate transport systems in retinal ischaemia. *Neurochem. Int.* *39*, 291–299.
- Baskys, A., Bayazitov, I., Fang, L., Blaabjerg, M., Poulsen, F.R., and Zimmer, J. (2005). Group I metabotropic glutamate receptors reduce excitotoxic injury and may facilitate neurogenesis. *Neuropharmacology* *49*, 146–156.
- Bassi, M.T., Gasol, E., Manzoni, M., Pineda, M., Riboni, M., Martín, R., Zorzano, A., Borsani, G., and Palacín, M. (2001). Identification and characterisation of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system xc-. *Pflugers Arch.* *442*, 286–296.
- Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A., and Schall, T.J. (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* *385*, 640–642.
- Beckman, J.S. (1996). Oxidative Damage and Tyrosine Nitration from Peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* *9*, 836–844.

- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., and Freeman, B.A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *87*, 1620–1624.
- Bell, R.D., Winkler, E.A., Singh, I., Sagare, A.P., Deane, R., Wu, Z., Holtzman, D.M., Betsholtz, C., Armulik, A., Sallstrom, J., et al. (2012). Apolipoprotein e controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature* *485*, 512–516.
- Berger, A., Devenyi, R., and Héon, E. (2016). Ontario health technology assessment series: Retinal prosthesis system for advanced retinitis pigmentosa: A health technology assessment. *Ont. Health Technol. Assess. Ser.* *16*, 1–63.
- Bernstein, P.S. (2009). Nutritional interventions against age-related macular degeneration. *Acta Hort.* *841*, 103–111.
- Berson, E.L. (1993). A Randomized Trial of Vitamin A and Vitamin E Supplementation for Retinitis Pigmentosa. *Arch. Ophthalmol.* *111*, 761.
- Bertelsen, M., Jensen, H., Bregnhøj, J.F., and Rosenberg, T. (2014). Prevalence of generalized retinal dystrophy in Denmark. *Ophthalmic Epidemiol* *21*, 217–223.
- Biarnés, M., Monés, J., Alonso, J., and Arias, L. (2011). Update on geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Optom. Vis. Sci.* *88*, 881–889.
- Bird, A.C., Bressler, N.M., Bressler, S.B., Chisholm, I.H., Coscas, G., Davis, M.D., de Jong, P.T.V.M., Klaver, C.C.W., Klein, B.E.K., Klein, R., et al. (1995). An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* *39*, 367–374.
- Bird, A.C., Phillips, R.L., and Hageman, G.S. (2014). Geographic atrophy: A histopathological assessment. *JAMA Ophthalmol.* *132*, 338–345.
- Blanks, J., Reif-Lehrer, L., and Casper, D. (1981). Effects of monosodium glutamate on the isolated retina of the chick embryo as a function of age: a morphological study. *Exp Eye Res* *32*, 105–124.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A.E., Datta, S.R., Takasu, M.A., and Greenberg, M.E. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* (80-.). *286*, 1358–1362.
- Boulton, M., and Dayhaw-Barker, P. (2001). The role of the retinal pigment epithelium: Topographical variation and ageing changes. *Eye* *15*, 384–389.
- Boven, L.A., Middel, J., Verhoef, J., De Groot, C.J.A., and Nottet, H.S.L.M. (2000). Monocyte infiltration is highly associated with loss of the tight junction protein zonula occludens in HIV-1-associated dementia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *26*, 356–360.

- Bradbury, M. (1979). Why a blood-brain barrier? *Trends Neurosci.* 2, 36–38.
- Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R., and Snyder, S.H. (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351, 714–718.
- Brennan, A.M., Won Suh, S., Joon Won, S., Narasimhan, P., Kauppinen, T.M., Lee, H., Edling, Y., Chan, P.H., and Swanson, R.A. (2009). NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat. Neurosci.* 12, 857–863.
- Bressler, N.M., and Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy (TAP) Study Group (2001). Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: two-year results of 2 randomized clinical trials-tap report 2. *Arch. Ophthalmol.* (Chicago, Ill. 1960) 119, 198–207.
- Bressler, N.M., Beck, R.W., and Ferris, F.L. (2011). Panretinal Photocoagulation for Proliferative Diabetic Retinopathy. *N. Engl. J. Med.* 365, 1520–1526.
- Brough, D., and Rothwell, N.J. (2007). Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. *J. Cell Sci.* 120, 772–781.
- Brown, J.C., Goldstein, J.E., Chan, T.L., Massof, R., and Ramulu, P. (2014). Characterizing functional complaints in patients seeking outpatient low-vision services in the United States. *Ophthalmology* 121, 1655–62.e1.
- Bruban, J., Maoui, A., Chalour, N., An, N., Jonet, L., Feumi, C., Tréton, J., Sennlaub, F., Behar-Cohen, F., Mascarelli, F., et al. (2011). CCR2/CCL2-mediated inflammation protects photoreceptor cells from amyloid- β -induced apoptosis. *Neurobiol. Dis.* 42, 55–72.
- Bruunsgaard, H., Skinhøj, P., Pedersen, A.N., Schroll, M., and Pedersen, B.K. (2000). Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and atherosclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* 121, 255–260.
- Bull, N.D., and Barnett, N.L. (2002). Antagonists of protein kinase C inhibit rat retinal glutamate transport activity in situ. *J. Neurochem.* 81, 472–480.
- Burdo, J., Dargusch, R., and Schubert, D. (2006). Distribution of the cystine/glutamate antiporter system xc⁻ in the brain, kidney, and duodenum. *J. Histochem. Cytochem.* 54, 549–557.
- Calippe, B., Augustin, S., Beguier, F., Charles-Messance, H., Poupel, L., Conart, J.-B., Hu, S.J., Lavalette, S., Fauvet, A., Rayes, J., et al. (2017). Complement Factor H Inhibits CD47-Mediated Resolution of Inflammation. *Immunity* 46.
- Cano, M., Thimmalappula, R., Fujihara, M., Nagai, N., Sporn, M., Wang, A.L., Neufeld, A.H., Biswal, S., and Handa, J.T. (2010). Cigarette smoking, oxidative stress, the anti-oxidant response through Nrf2 signaling, and Age-related Macular Degeneration. *Vision Res.* 50, 652–664.

Cardona, A.E., Piore, E.P., Sasse, M.E., Kostenko, V., Cardona, S.M., Dijkstra, I.M., Huang, D.R., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., et al. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat. Neurosci.* *9*, 917–924.

Cayouette, M., Behn, D., Sendtner, M., Lachapelle, P., and Gravel, C. (1998). Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor prevents death and increases responsiveness of rod photoreceptors in the retinal degeneration slow mouse. *J. Neurosci.* *18*, 9282–9293.

Cayrol, C., and Girard, J.-P. (2009). The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 9021–9026.

Chakravarthy, U., Augood, C., Bentham, G.C., de Jong, P.T.V.M., Rahu, M., Seland, J., Soubrane, G., Tomazzoli, L., Topouzis, F., Vingerling, J.R., et al. (2007). Cigarette Smoking and Age-Related Macular Degeneration in the EUREYE Study. *Ophthalmology* *114*, 1157–1163.

Chakravarthy, U., Wong, T.Y., Fletcher, A., Piau, E., Evans, C., Zlateva, G., Buggage, R., Pleil, A., and Mitchell, P. (2010). Clinical risk factors for age-related macular degeneration: A systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol.* *10*, 31.

Chao, C.C., Hu, S., Ehrlich, L., and Peterson, P.K. (1995). Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain. Behav. Immun.* *9*, 355–365.

Chen, C., Chen, H., Xu, C., Zhong, Y., and Shen, X. (2014). Role of interleukin-1 β in hypoxia-induced depression of glutamate uptake in retinal Müller cells. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* *252*, 51–58.

Chen, H., Liu, B., Lukas, T.J., and Neufeld, A.H. (2008). The aged retinal pigment epithelium/choroid: A potential substratum for the pathogenesis of age-related macular degeneration. *PLoS One* *3*, e2339.

Chen, M., Rajapakse, D., Fraczek, M., Luo, C., Forrester, J. V, and Xu, H. (2016). Retinal pigment epithelial cell multinucleation in the aging eye - a mechanism to repair damage and maintain homeostasis. *Aging Cell* *15*, 436–445.

Chen, Q., Surmeier, D.J., and Reiner, A. (1999). NMDA and non-NMDA receptor-mediated excitotoxicity are potentiated in cultured striatal neurons by prior chronic depolarization. *Exp. Neurol.* *159*, 283–296.

Chittajallu, R., Vignes, M., Dev, K.K., Barnes, J.M., Collingridge, G.L., and Henley, J.M. (1996). Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature* *379*, 78–81.

Choi, D. (1998). Antagonizing excitotoxicity: a therapeutic strategy for stroke? *Mt Sinai J Med* *65*, 133–138.

- Choi, D.W., Maulucci-Gedde, M., and Kriegstein, A.R. (1987). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* *7*, 357–368.
- Chow, J.C., Young, D.W., Golenbock, D.T., Christ, W.J., and Gusovsky, F. (1999). Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* *274*, 10689–10692.
- Chuluundorj, D., Harding, S.A., Abernethy, D., and La Flamme, A.C. (2014). Expansion and preferential activation of the CD14⁺ CD16⁺ monocyte subset during multiple sclerosis. *Immunol. Cell Biol.* *92*, 509–517.
- Chung, W.J., Lyons, S.A., Nelson, G.M., Hamza, H., Gladson, C.L., Gillespie, G.Y., and Sontheimer, H. (2005). Inhibition of Cystine Uptake Disrupts the Growth of Primary Brain Tumors. *J. Neurosci.* *25*, 7101–7110.
- Cipriani, R., Chara, J.C., Rodríguez-Antigüedad, A., and Matute, C. (2015). FTY720 attenuates excitotoxicity and neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* *12*, 86.
- Colwell, C.S., and Levine, M.S. (1999). Metabotropic glutamate receptor modulation of excitotoxicity in the neostriatum: role of calcium channels. *Brain Res.* *833*, 234–241.
- Combadière, C., Feumi, C., Raoul, W., Keller, N., Rodéro, M., Pézard, A., Lavalette, S., Houssier, M., Jonet, L., Picard, E., et al. (2007). CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J. Clin. Invest.* *117*, 2920–2928.
- Conradt, M., and Stoffel, W. (1997). Inhibition of the high-affinity brain glutamate transporter GLAST-1 via direct phosphorylation. *J. Neurochem.* *68*, 1244–1251.
- Cooper, A.J., and Kristal, B.S. (1997). Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol. Chem.* *378*, 793–802.
- Cousins, S.W., Espinosa-Heidmann, D.G., and Csaky, K.G. (2004). Monocyte activation in patients with age-related macular degeneration: A biomarker of risk for choroidal neovascularization? *Arch. Ophthalmol.* *122*, 1013–1018.
- Coyle, J.T., and Schwarcz, R. (1976). Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature* *263*, 244–246.
- Cruz-Guilloty, F., Saeed, A.M., Echegaray, J.J., Duffort, S., Ballmick, A., Tan, Y., Betancourt, M., Viteri, E., Ramkhillawan, G.C., Ewald, E., et al. (2013). Infiltration of proinflammatory M1 macrophages into the outer retina precedes damage in a mouse model of age-related macular degeneration. *Int. J. Inflamm.* *2013*, 1–12.
- Cull-Candy, S.G., and Leszkiewicz, D.N. (2004). Role of Distinct NMDA Receptor Subtypes at Central Synapses. *Sci. Signal.* *2004*, re16-re16.

- Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J., and Diehl, J.A. (2003). Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. *Mol. Cell Biol.* *23*, 7198–7209.
- Curcio, C.A. (2001). Photoreceptor topography in ageing and age-related maculopathy. *Eye (Lond)*. *15*, 376–383.
- Curcio, C.A., and Millican, C.L. (1999). Basal linear deposit and large drusen are specific for early age-related maculopathy. *Arch. Ophthalmol.* *117*, 329–339.
- Curcio, C.A., Millican, C.L., Bailey, T., and Kruth, H.S. (2001). Accumulation of cholesterol with age in human Bruch's membrane. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* *42*, 265–274.
- Damani, M.R., Zhao, L., Fontainhas, A.M., Amaral, J., Fariss, R.N., and Wong, W.T. (2011). Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia. *Aging Cell* *10*, 263–276.
- Van Damme, P., Van Den Bosch, L., Van Houtte, E., Eggermont, J., Callewaert, G., and Robberecht, W. (2002). Na(+) entry through AMPA receptors results in voltage-gated k(+) channel blockade in cultured rat spinal cord motoneurons. *J. Neurophysiol.* *88*, 965–972.
- Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell Death: Critical Control Points. *Cell* *116*, 205–219.
- Datta, S., Cano, M., Ebrahimi, K., Wang, L., and Handa, J.T. (2017). The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Prog. Retin. Eye Res.* *60*, 201–218.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V, Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* *8*, 752–758.
- Davis, E.J., Foster, T.D., and Thomas, W.E. (1994). Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res. Bull.* *34*, 73–78.
- Delyfer, M.-N., Forster, V., Neveux, N., Picaud, S., Léveillard, T., and Sahel, J.-A. (2005). Evidence for glutamate-mediated excitotoxic mechanisms during photoreceptor degeneration in the rd1 mouse retina. *Mol. Vis.* *11*, 688–696.
- Dinarello, C.A. (1994). Interleukin-1 in Disease. *Keio J. Med.* *43*, 131–136.
- DiScipio, R.G., Daffern, P.J., Schraufstatter, I.U., and Sriramarao, P. (1998). Human polymorphonuclear leukocytes adhere to complement factor H through an interaction that involves alphaMbeta2 (CD11b/CD18). *J. Immunol.* *160*, 4057–4066.
- Doherty, A.J., Collingridge, G.L., and Jane, D.E. (1999). Antagonist activity of alpha-substituted 4-carboxyphenylglycine analogues at group I metabotropic glutamate receptors expressed in CHO cells. *Br. J. Pharmacol.* *126*, 205–210.

Domercq, M., Sanchez-Gomez, M. V., Sherwin, C., Etxebarria, E., Fern, R., and Matute, C. (2007). System xc- and Glutamate Transporter Inhibition Mediates Microglial Toxicity to Oligodendrocytes. *J. Immunol.* *178*, 6549–6556.

Dornonville de la Cour, M. (1993). Ion transport in the retinal pigment epithelium. A study with double barrelled ion-selective microelectrodes. *Acta Ophthalmol. Suppl. (Oxf.)*. 1–32.

Dostert, C., Pétrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B.T., and Tschopp, J. (2008). Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science (80-)*. *320*, 674–677.

Doyle, S.L., Campbell, M., Ozaki, E., Salomon, R.G., Mori, A., Kenna, P.F., Farrar, G.J., Kiang, A.S., Humphries, M.M., Lavelle, E.C., et al. (2012). NLRP3 has a protective role in age-related macular degeneration through the induction of IL-18 by drusen components. *Nat. Med.* *18*, 791–798.

Dringen, R., and Hirrlinger, J. (2003). Glutathione pathways in the brain. *Biol. Chem.* *384*, 505–516.

Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* *82*, 47–95.

Dugan, L.L., Sensi, S.L., Canzoniero, L.M., Handran, S.D., Rothman, S.M., Lin, T.S., Goldberg, M.P., and Choi, D.W. (1995). Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species in Cortical Neurons Following Exposure to N-methyl-D-Aspartate. *J. Neurosci.* *15*, 6377–6388.

Dun, Y., Mysona, B., Van Ells, T., Amarnath, L., Shamsul Ola, M., Ganapathy, V., and Smith, S.B. (2006). Expression of the cystine-glutamate exchanger (xc-) in retinal ganglion cells and regulation by nitric oxide and oxidative stress. *Cell Tissue Res.* *324*, 189–202.

Eandi, C.M., Messance, H.C., Augustin, S., Dominguez, E., Lavalette, S., Forster, V., Hu, S.J., Siquieros, L., Craft, C.M., Sahel, J.A., et al. (2016). Subretinal mononuclear phagocytes induce cone segment loss via IL-1 β . *Elife* *5*.

Edwards, A.O., Ritter, R., Abel, K.J., Manning, A., Panhuysen, C., and Farrer, L.A. (2005). Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science (80-)*. *308*, 421–424.

Eldadah, B.A., and Faden, A.I. (2000). Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J. Neurotrauma* *17*, 811–829.

Eliasof, S., Arriza, J.L., Leighton, B.H., Kavanaugh, M.P., and Amara, S.G. (1998). Excitatory amino acid transporters of the salamander retina: identification, localization, and function. *J. Neurosci.* *18*, 698–712.

- Epelman, S., Lavine, K.J., Beaudin, A.E., Sojka, D.K., Carrero, J.A., Calderon, B., Brija, T., Gautier, E.L., Ivanov, S., Satpathy, A.T., et al. (2014). Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* 40, 91–104.
- Estevez, A.G., Spear, N., Manuel, S.M., Barbeito, L., Radi, R., and Beckman, J.S. (1998). Role of endogenous nitric oxide and peroxynitrite formation in the survival and death of motor neurons in culture. *Prog. Brain Res.* 118, 269–280.
- Ezekowitz, R.A., Sim, R.B., Hill, M., and Gordon, S. (1984). Local opsonization by secreted macrophage complement components. Role of receptors for complement in uptake of zymosan. *J. Exp. Med.* 159, 244–260.
- Ferkany, J.W., Zaczek, R., and Coyle, J.T. (1982). Kainic acid stimulates excitatory amino acid neurotransmitter release at presynaptic receptors. *Nature* 298, 757–759.
- Fine, S.M., Angel, R.A., Perry, S.W., Epstein, L.G., Rothstein, J.D., Dewhurst, S., and Gelbard, H.A. (1996). Tumor necrosis factor alpha inhibits glutamate uptake by primary human astrocytes. Implications for pathogenesis of HIV-1 dementia. *J. Biol. Chem.* 271, 15303–15306.
- Finnemann, S.C. (2003). Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors. *EMBO J.* 22, 4143–4154.
- Fleckenstein, M., Schmitz-Valckenberg, S., Adrion, C., Krämer, I., Eter, N., Helb, H.M., Brinkmann, C.K., Issa, P.C., Mansmann, U., and Holz, F.G. (2010). Tracking progression with spectral-domain optical coherence tomography in geographic atrophy caused by age-related macular degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 3846–3852.
- Fletcher, A.E., Bentham, G.C., Agnew, M., Young, I.S., Augood, C., Chakravarthy, U., De Jong, P.T.V.M., Rahu, M., Seland, J., Soubrane, G., et al. (2008). Sunlight exposure, antioxidants, and age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 126, 1396–1403.
- Fletcher, E.L., Hack, I., Brandstätter, J.H., and Wässle, H. (2000). Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. *J. Comp. Neurol.* 420, 98–112.
- Fogal, B., Li, J., Lobner, D., McCullough, L.D., and Hewett, S.J. (2007). System xc Activity and Astrocytes Are Necessary for Interleukin-1 -Mediated Hypoxic Neuronal Injury. *J. Neurosci.* 27, 10094–10105.
- Fontaine, V., Kinkl, N., Sahel, J., Dreyfus, H., and Hicks, D. (1998). Survival of purified rat photoreceptors in vitro is stimulated directly by fibroblast growth factor-2. *J. Neurosci.* 18, 9662–9672.
- Fontainhas, A.M., Wang, M., Liang, K.J., Chen, S., Mettu, P., Damani, M., Fariss, R.N., Li, W., and Wong, W.T. (2011). Microglial morphology and dynamic behavior is regulated by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *PLoS One* 6, e15973.

Frade, J.M., Rodriguez-Tebar, A., and Barde, Y.A. (1996). Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 383, 166–168.

Francke, M., Faude, F., Pannicke, T., Bringmann, A., Eckstein, P., Reichelt, W., Wiedemann, P., and Reichenbach, A. (2001). Electrophysiology of rabbit Müller (glial) cells in experimental retinal detachment and PVR. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1072–1079.

Frasson, M., Picaud, S., Léveillard, T., Simonutti, M., Mohand-Said, S., Dreyfus, H., Hicks, D., and Sahel, J. (1999). Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 2724–2734.

Friedman, D.S., O'Colmain, B.J., Muñoz, B., Tomany, S.C., McCarty, C., DeJong, P.T.V.M., Nemesure, B., Mitchell, P., Kempen, J., and Congdon, N. (2004). Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in the United States. *Arch. Ophthalmol.* 122, 564–572.

Fritsche, L.G., Chen, W., Schu, M., Yaspan, B.L., Yu, Y., Thorleifsson, G., Zack, D.J., Arakawa, S., Cipriani, V., Ripke, S., et al. (2013). Seven new loci associated with age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* 45, 433–439.

Fritsche, L.G., Fariss, R.N., Stambolian, D., Abecasis, G.R., Curcio, C.A., and Swaroop, A. (2014). Age-Related Macular Degeneration: Genetics and Biology Coming Together. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 15, 151–171.

Fritsche, L.G., Igl, W., Bailey, J.N.C., Grassmann, F., Sengupta, S., Bragg-Gresham, J.L., Burdon, K.P., Hebbbring, S.J., Wen, C., Gorski, M., et al. (2015). A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nat. Genet.* 48, 134–143.

Fukui, M., Song, J.H., Choi, J., Choi, H.J., and Zhu, B.T. (2009). Mechanism of glutamate-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. *Eur. J. Pharmacol.* 617, 1–11.

van Furth, R. (1976). Origin and Kinetics of Mononuclear Phagocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 278, 161–175.

Gal, A., Li, Y., Thompson, D.A., Weir, J., Orth, U., Jacobson, S.G., Apfelstedt-Sylla, E., and Vollrath, D. (2000). Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 26, 270–271.

Garlanda, C., Dinarello, C.A., and Mantovani, A. (2013). The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity* 39, 1003–1018.

Gautier, E.L., and Yvan-Charvet, L. (2014). Understanding macrophage diversity at the ontogenic and transcriptomic levels. *Immunol. Rev.* 262, 85–95.

Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71–82.

Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* (80-.). 327, 656–661.

- Gerhardinger, C., Costa, M.B., Coulombe, M.C., Toth, I., Hoehn, T., and Grosu, P. (2005). Expression of acute-phase response proteins in retinal Müller cells in diabetes. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* *46*, 349–357.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010a). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* (80-). *330*, 841–845.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010b). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* (80-). *330*, 841–845.
- Gout, P.W., Buckley, A.R., Simms, C.R., and Bruchovsky, N. (2001). Sulfasalazine, a potent suppressor of lymphoma growth by inhibition of the x- c cystine transporter: A new action for an old drug. *Leukemia* *15*, 1633–1640.
- Greger, I.H., Khatri, L., and Ziff, E.B. (2002). RNA editing at Arg607 controls AMPA receptor exit from the endoplasmic reticulum. *Neuron* *34*, 759–772.
- Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R., and Ferguson, T.A. (1995). Fas Ligand-Induced Apoptosis as a Mechanism of Immune Privilege. *Science* (80-). *270*, 1189–1192.
- Grishanin, R.N., Yang, H., Liu, X., Donohue-Rolfe, K., Nune, G.C., Zang, K., Xu, B., Duncan, J.L., LaVail, M.M., Copenhagen, D.R., et al. (2008). Retinal TrkB receptors regulate neural development in the inner, but not outer, retina. *Mol. Cell. Neurosci.* *38*, 431–443.
- Grunewald, M., and Kanner, B.I. (2000). The accessibility of a novel reentrant loop of the glutamate transporter GLT-1 is restricted by its substrate. *J. Biol. Chem.* *275*, 9684–9689.
- Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J. Exp. Med.* *210*, 1977–1992.
- Guo, C., Otani, A., Oishi, A., Kojima, H., Makiyama, Y., Nakagawa, S., and Yoshimura, N. (2012). Knockout of *ccr2* alleviates photoreceptor cell death in a model of retinitis pigmentosa. *Exp. Eye Res.* *104*, 39–47.
- Gupta, N., Brown, K.E., and Milam, A.H. (2003). Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* *76*, 463–471.
- Hageman, G.S., Anderson, D.H., Johnson, L. V., Hancox, L.S., Taiber, A.J., Hardisty, L.I., Hageman, J.L., Stockman, H.A., Borchardt, J.D., Gehrs, K.M., et al. (2005). A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 7227–7232.

- Haller, J.A. (2013). Current anti-vascular endothelial growth factor dosing regimens: Benefits and burden. *Ophthalmology* 120, S3–S7.
- Ham, W.T., Ruffolo, J.J., Mueller, H.A., Clarke, A.M., and Moon, M.E. (1978). Histologic analysis of photochemical lesions produced in rhesus retina by short-wavelength light. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 17, 1029–1035.
- Hamann, S. (2002). Molecular mechanisms of water transport in the eye. *Int. Rev. Cytol.* 215, 395–431.
- Hamel, C. (2006). Retinitis pigmentosa. *Orphanet J. Rare Dis.* 1, 40.
- Harada, C., Harada, T., Quah, H.M.A., Maekawa, F., Yoshida, K., Ohno, S., Wada, K., Parada, L.F., and Tanaka, K. (2003). Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Müller glial cells during light-induced retinal degeneration. *Neuroscience* 122, 229–235.
- Harada, C., Azuchi, Y., Noro, T., Guo, X., Kimura, A., Namekata, K., and Harada, T. (2015). TrkB signaling in retinal glia stimulates neuroprotection after optic nerve injury. *Am. J. Pathol.* 185, 3238–3247.
- Harada, T., Harada, C., Watanabe, M., Inoue, Y., Sakagawa, T., Nakayama, N., Sasaki, S., Okuyama, S., Watase, K., Wada, K., et al. (1998). Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 4663–4666.
- Harada, T., Harada, C., Kohsaka, S., Wada, E., Yoshida, K., Ohno, S., Mamada, H., Tanaka, K., Parada, L.F., and Wada, K. (2002). Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J. Neurosci.* 22, 9228–9236.
- Harrison, J.K., Jiang, Y., Chen, S., Xia, Y., Maciejewski, D., McNamara, R.K., Streit, W.J., Salafranca, M.N., Adhikari, S., Thompson, D.A., et al. (1998). Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 10896–10901.
- Hartveit, E. (1997). Functional organization of cone bipolar cells in the rat retina. *J. Neurophysiol.* 77 VN-r, 1716–1730.
- Harvey, D.M., and Calkins, D.J. (2002). Localization of kainate receptors to the presynaptic active zone of the rod photoreceptor in primate retina. *Vis. Neurosci.* 19, 681–692.
- Hauck, S.M., Kinkl, N., Deeg, C.A., Swiatek-de Lange, M., Schöffmann, S., and Ueffing, M. (2006). GDNF family ligands trigger indirect neuroprotective signaling in retinal glial cells. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2746–2757.
- Haumann, I., Junghans, D., Anstötz, M., and Frotscher, M. (2017). Presynaptic localization of GluK5 in rod photoreceptors suggests a novel function of high affinity glutamate receptors in the mammalian retina. *PLoS One* 12, e0172967.

- He, Y., Jackman, N.A., Thorn, T.L., Vought, V.E., and Hewett, S.J. (2015). Interleukin-1 β protects astrocytes against oxidant-induced injury via an NF- κ B-Dependent upregulation of glutathione synthesis. *Glia* 63, 1568–1580.
- Hearps, A.C., Martin, G.E., Angelovich, T.A., Cheng, W.J., Maisa, A., Landay, A.L., Jaworowski, A., and Crowe, S.M. (2012). Aging is associated with chronic innate immune activation and dysregulation of monocyte phenotype and function. *Aging Cell* 11, 867–875.
- Helton, T.D., Otsuka, T., Lee, M.-C., Mu, Y., and Ehlers, M.D. (2008). Pruning and loss of excitatory synapses by the parkin ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 19492–19497.
- Henley, J.M., and Wilkinson, K.A. (2016). Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 337–350.
- Hensley, K., Robinson, K.A., Gabbita, S.P., Salsman, S., and Floyd, R.A. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1456–1462.
- Higgins, G.C., Beart, P.M., and Nagley, P. (2009). Oxidative stress triggers neuronal caspase-independent death: Endonuclease G involvement in programmed cell death-type III. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 2773–2787.
- Hitzler, I., Sayi, A., Kohler, E., Engler, D.B., Koch, K.N., Hardt, W.-D., and Muller, A. (2012). Caspase-1 Has Both Proinflammatory and Regulatory Properties in Helicobacter Infections, Which Are Differentially Mediated by Its Substrates IL-1 and IL-18. *J. Immunol.* 188, 3594–3602.
- Holmin, S., and Mathiesen, T. (2000). Intracerebral administration of interleukin-1 β and induction of inflammation, apoptosis, and vasogenic edema. *J. Neurosurg.* 92, 108–120.
- Holz, F.G., Strauss, E.C., Schmitz-Valckenberg, S., and Van Lookeren Campagne, M. (2014). Geographic atrophy: Clinical features and potential therapeutic approaches. *Ophthalmology* 121, 1079–1091.
- Hotamisligil, G., Shargill, N., and Spiegelman, B. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* (80-.). 259, 87–91.
- Housset, M., and Sennlaub, F. (2015). Thrombospondin-1 and Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 31, 1–7.
- Housset, M., Samuel, A., Ettaiche, M., Bemelmans, A., Beby, F., Billon, N., and Lamonerie, T. (2013). Loss of Otx2 in the Adult Retina Disrupts Retinal Pigment Epithelium Function, Causing Photoreceptor Degeneration. *J. Neurosci.* 33, 9890–9904.
- Hu, R.G., Lim, J., Donaldson, P.J., and Kalloniatis, M. (2008). Characterization of the cystine/glutamate transporter in the outer plexiform layer of the vertebrate retina. *Eur. J. Neurosci.* 28, 1491–1502.

- Hu, S.J., Calippe, B., Lavalette, S., Roubex, C., Montassar, F., Housset, M., Levy, O., Delarasse, C., Paques, M., Sahel, J.A., et al. (2015). Upregulation of P2RX7 in Cx3cr1-deficient mononuclear phagocytes leads to increased interleukin-1 β secretion and photoreceptor neurodegeneration. *J. Neurosci.* *35*, 6987–6996.
- Huang, Y., Smith, D.E., Ibanez-Sandoval, O., Sims, J.E., and Friedman, W.J. (2011). Neuron-Specific Effects of Interleukin-1 Are Mediated by a Novel Isoform of the IL-1 Receptor Accessory Protein. *J. Neurosci.* *31*, 18048–18059.
- Hunter, M.I., Nlemadim, B.C., and Davidson, D.L. (1985). Lipid peroxidation products and antioxidant proteins in plasma and cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Neurochem. Res.* *10*, 1645–1652.
- Iglesias, R., Dahl, G., Qiu, F., Spray, D.C., and Scemes, E. (2009). Pannexin 1: The Molecular Substrate of Astrocyte “Hemichannels.” *J. Neurosci.* *29*, 7092–7097.
- Iino, M., Ozawa, S., and Tsuzuki, K. (1990). Permeation of calcium through excitatory amino acid receptor channels in cultured rat hippocampal neurones. *J. Physiol.* *424*, 151–165.
- Ishibashi, T., Hata, Y., Yoshikawa, H., Sueishi, K., and Inomata, H. (1997). Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization. *Graefe’s Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* *235*, 159–167.
- Ishida, B.Y., Bailey, K.R., Duncan, K.G., Chalkley, R.J., Burlingame, A.L., Kane, J.P., and Schwartz, D.M. (2004). Regulated expression of apolipoprotein E by human retinal pigment epithelial cells. *J. Lipid Res.* *45*, 263–271.
- Ishida, K., Panjwani, N., Cao, Z., and Streilein, J.W. (2003). Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms. *Ocul. Immunol. Inflamm.* *11*, 91–105.
- Ishikawa, M. (2013). Abnormalities in Glutamate Metabolism and Excitotoxicity in the Retinal Diseases. *Scientifica (Cairo)*. *2013*, 1–13.
- Izumi-Nagai, K., Nagai, N., Ozawa, Y., Mihara, M., Ohsugi, Y., Kurihara, T., Koto, T., Satofuka, S., Inoue, M., Tsubota, K., et al. (2007). Interleukin-6 receptor-mediated activation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) promotes choroidal neovascularization. *Am. J. Pathol.* *170*, 2149–2158.
- Jablonski, M.M., Freeman, N.E., Orr, W.E., Templeton, J.P., Lu, L., Williams, R.W., and Geisert, E.E. (2011). Genetic pathways regulating glutamate levels in retinal müller cells. *Neurochem. Res.* *36*, 594–603.
- Jackman, N.A., Uliasz, T.F., Hewett, J.A., and Hewett, S.J. (2010a). Regulation of system xc⁻ activity and expression in astrocytes by interleukin-1 beta: Implications for hypoxic neuronal injury. *Glia* *58*, 1806–1815.

Jackman, N.A., Uliasz, T.F., Hewett, J.A., and Hewett, S.J. (2010b). Regulation of system xc⁻ activity and expression in astrocytes by interleukin-1 beta: Implications for hypoxic neuronal injury. *Glia* 58, 1806–1815.

Jackman, N.A., Melchior, S.E., Hewett, J.A., and Hewett, S.J. (2012a). Non-Cell Autonomous Influence of the Astrocyte System xc⁻ on Hypoglycaemic Neuronal Cell Death. *ASN Neuro* 4, AN20110030.

Jackman, N.A., Melchior, S.E., Hewett, J.A., and Hewett, S.J. (2012b). Non-Cell Autonomous Influence of the Astrocyte System xc⁻ on Hypoglycaemic Neuronal Cell Death. *ASN Neuro* 4, AN20110030.

Jager, J., Grémeaux, T., Cormont, M., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J.F. (2007). Interleukin-1 β -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* 148, 241–251.

Jakobs, T.C., Ben, Y., and Masland, R.H. (2007). Expression of mRNA for glutamate receptor subunits distinguishes the major classes of retinal neurons, but is less specific for individual cell types. *Mol. Vis.* 13, 933–948.

James A Dixon, Scott CN Oliver, Jeffrey L Olson, N.M. (2009). VEGF Trap-Eye for the treatment of neovascular age-related macular degeneration VEGF Trap-Eye for the treatment of neovascular age-related macular degeneration ut rm h r. *Expert Opin. Investig. Drugs* 18, 1573–1580.

Johnson, T. V., Bull, N.D., and Martin, K.R. (2011). Neurotrophic factor delivery as a protective treatment for glaucoma. *Exp. Eye Res.* 93, 196–203.

Ju, W.-K., Lindsey, J.D., Angert, M., Patel, A., and Weinreb, R.N. (2008). Glutamate receptor activation triggers OPA1 release and induces apoptotic cell death in ischemic rat retina. *Mol. Vis.* 14, 2629–2638.

Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., and Littman, D.R. (2000). Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4106–4114.

Kang, S.M., Schneider, D.B., Lin, Z., Hanahan, D., Dichek, D.A., Stock, P.G., and Baekkeskov, S. (1997). Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction. *Nat. Med.* 3, 738–743.

Kang, Y.H., Urban, B.C., Sim, R.B., and Kishore, U. (2012). Human complement Factor H modulates C1q-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *Immunobiology* 217, 455–464.
Kapoor, R., Davies, M., Blaker, P.A., Hall, S.M., and Smith, K.J. (2003). Blockers of sodium and calcium entry protect axons from nitric oxide-mediated degeneration. *Ann. Neurol.* 53, 174–180.

Kato, S., Ishita, S., Sugawara, K., and Mawatari, K. (1993). Cystine/glutamate antiporter expression in retinal müller glial cells: Implications for dl-alpha-amino adipate toxicity. *Neuroscience* 57, 473–482.

Kawano, Y., Nakae, J., Watanabe, N., Kikuchi, T., Tateya, S., Tamori, Y., Kaneko, M., Abe, T., Onodera, M., and Itoh, H. (2016). Colonic Pro-inflammatory Macrophages Cause Insulin Resistance in an Intestinal Ccl2/Ccr2-Dependent Manner. *Cell Metab.* *24*, 295–310.

Kiagiadaki, F., Savvaki, M., and Thermos, K. (2010). Activation of somatostatin receptor (sst5) protects the rat retina from AMPA-induced neurotoxicity. *Neuropharmacology* *58*, 297–303.

Kigerl, K.A., Ankeny, D.P., Garg, S.K., Wei, P., Guan, Z., Lai, W., McTigue, D.M., Banerjee, R., and Popovich, P.G. (2012). System x(c)(-) regulates microglia and macrophage glutamate excitotoxicity in vivo. *Exp. Neurol.* *233*, 333–341.

Kim, Y., Tarallo, V., Kerur, N., Yasuma, T., Gelfand, B.D., Bastos-Carvalho, A., Hirano, Y., Yasuma, R., Mizutani, T., Fowler, B.J., et al. (2014). DICER1/ Alu RNA dysmetabolism induces Caspase-8-mediated cell death in age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 16082–16087.

Kirsch, M., Lee, M.Y., Meyer, V., Wiese, A., and Hofmann, H.D. (1997). Evidence for multiple, local functions of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in retinal development: expression of CNTF and its receptors and in vitro effects on target cells. *J Neurochem* *68*, 979–990.

Klaver, C.C.W., Kliffen, M., van Duijn, C.M., Hofman, A., Cruts, M., Grobbee, D.E., van Broeckhoven, C., and de Jong, P.T.V.M. (1998). Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* *63*, 200–206.

Klein, R., Klein, B.E., Tomany, S.C., Meuer, S.M., and Huang, G.H. (2002). Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: The Beaver Dam eye study. *Ophthalmology* *109*, 1767–1779.

Klein, R., Peto, T., Bird, A., and Vannewkirk, M.R. (2004). The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* *137*, 486–495.

Kobayashi, A., Kang, M.-I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., and Yamamoto, M. (2004). Oxidative Stress Sensor Keap1 Functions as an Adaptor for Cul3-Based E3 Ligase To Regulate Proteasomal Degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 7130–7139.

Koeberle, P.D., and Bähr, M. (2008). The upregulation of GLAST-1 is an indirect antiapoptotic mechanism of GDNF and neurturin in the adult CNS. *Cell Death Differ.* *15*, 471–483.

Kofuji, P., Ceelen, P., Zahs, K.R., Surbeck, L.W., Lester, H.A., and Newman, E.A. (2000). Genetic Inactivation of an Inwardly Rectifying Potassium Channel (Kir4.1 Subunit) in Mice: Phenotypic Impact in Retina. *J. Neurosci.* *20*, 5733–5740.

Koh, A., Lee, W.K., Chen, L.J., Chen, S.J., Hashad, Y., Kim, H., Lai, T.Y., Pilz, S., Ruamviboonsuk, P., Tokaji, E., et al. (2012). Everest study: Efficacy and safety of verteporfin photodynamic therapy in combination with ranibizumab or alone versus ranibizumab monotherapy in patients with symptomatic macular polypoidal choroidal vasculopathy. *Retina* 32, 1453–1464.

Köhler, M., Burnashev, N., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1993). Determinants of Ca²⁺ permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: Diversity by RNA editing. *Neuron* 10, 491–500.

Kohno, H., Chen, Y., Kevany, B.M., Pearlman, E., Miyagi, M., Maeda, T., Palczewski, K., and Maeda, A. (2013). Photoreceptor proteins initiate microglial activation via toll-like receptor 4 in retinal degeneration mediated by all-trans-retinal. *J. Biol. Chem.* 288, 15326–15341.

Konari, K., Sawada, N., Zhong, Y., Isomura, H., Nakagawa, T., and Mori, M. (1995). Development of the blood-retinal barrier in vitro: Formation of tight junctions as revealed by occludin and ZO-1 correlates with the barrier function of chick retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 61, 99–108.

Koprach, J.B., Reske-Nielsen, C., Mithal, P., and Isacson, O. (2008). Neuroinflammation mediated by IL-1 β increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *J. Neuroinflammation* 5, 8.

Lai, T.W., Zhang, S., and Wang, Y.T. (2014). Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* 115, 157–188.

Landshamer, S., Hoehn, M., Barth, N., Duvezin-Caubet, S., Schwake, G., Tobaben, S., Kazhdan, I., Becattini, B., Zahler, S., Vollmar, A., et al. (2008). Bid-induced release of AIF from mitochondria causes immediate neuronal cell death. *Cell Death Differ.* 15, 1553–1563.

Lapchak, P.A. (2010). A critical assessment of edaravone acute ischemic stroke efficacy trials: is edaravone an effective neuroprotective therapy? *Expert Opin. Pharmacother.* 11, 1753–1763.

Lauri, S.E., Vesikansa, A., Segerstråle, M., Collingridge, G.L., Isaac, J.T.R., and Taira, T. (2006). Functional Maturation of CA1 Synapses Involves Activity-Dependent Loss of Tonic Kainate Receptor-Mediated Inhibition of Glutamate Release. *Neuron* 50, 415–429.

LaVail, M.M., Unoki, K., Yasumura, D., Matthes, M.T., Yancopoulos, G.D., and Steinberg, R.H. (1992). Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 11249–11253.

Lavalette, S., Raoul, W., Houssier, M., Camelo, S., Levy, O., Calippe, B., Jonet, L., Behar-Cohen, F., Chemtob, S., Guillonneau, X., et al. (2011). Interleukin-1 β inhibition prevents choroidal neovascularization and does not exacerbate photoreceptor degeneration. *Am. J. Pathol.* 178, 2416–2423.

- Lawler, J., and Hynes, R.O. (1986). The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J. Cell Biol.* *103*, 1635–1648.
- Lechner, J., Chen, M., Hogg, R.E., Toth, L., Silvestri, G., Chakravarthy, U., and Xu, H. (2017). Peripheral blood mononuclear cells from neovascular age-related macular degeneration patients produce higher levels of chemokines CCL2 (MCP-1) and CXCL8 (IL-8). *J. Neuroinflammation* *14*, 42.
- Lees, K.R. (1998). Does neuroprotection improve stroke outcome? *Lancet* *351*, 1447–1448.
- Lees, K.R., Zivin, J.A., Ashwood, T., Davalos, A., Davis, S.M., Diener, H.-C., Grotta, J., Lyden, P., Shuaib, A., Hårdemark, H.-G., et al. (2006). NXY-059 for Acute Ischemic Stroke. *N. Engl. J. Med.* *354*, 588–600.
- Lehre, K.P., Davanger, S., and Danbolt, N.C. (1997). Localization of the glutamate transporter protein GLAST in rat retina. *Brain Res.* *744*, 129–137.
- Lerma, J., and Marques, J.M. (2013). Kainate receptors in health and disease. *Neuron* *80*, 292–311.
- Levy, O., Calippe, B., Lavalette, S., Hu, S.J., Raoul, W., Dominguez, E., Housset, M., Paques, M., Sahel, J.-A., Bemelmans, A.-P., et al. (2015a). Apolipoprotein E promotes subretinal mononuclear phagocyte survival and chronic inflammation in age-related macular degeneration. *EMBO Mol. Med.* *7*, 211–226.
- Levy, O., Lavalette, S., Hu, S.J., Housset, M., Raoul, W., Eandi, C., Sahel, J.-A., Sullivan, P.M., Guillonnet, X., and Sennlaub, F. (2015b). APOE Isoforms Control Pathogenic Subretinal Inflammation in Age-Related Macular Degeneration. *J. Neurosci.* *35*, 13568–13576.
- Lewerenz, J., Klein, M., and Methner, A. (2006a). Cooperative action of glutamate transporters and cystine/glutamate antiporter system Xc-protects from oxidative glutamate toxicity. *J. Neurochem.* *98*, 916–925.
- Lewerenz, J., Klein, M., and Methner, A. (2006b). Cooperative action of glutamate transporters and cystine/glutamate antiporter system Xc-protects from oxidative glutamate toxicity. *J. Neurochem.* *98*, 916–925.
- Li, Q., and Puro, D.G. (2002). Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Müller cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* *43*, 3109–3116.
- Li, Y., Maher, P.A., and Schubert, D.R. (1997a). A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. *Neuron* *19*, 453–463.
- Li, Y., Maher, P., and Schubert, D. (1997b). Requirement for cGMP in nerve cell death caused by glutathione depletion. *J. Cell Biol.* *139*, 1317–1324.

- Li, Y., Du, X.F., Liu, C.S., Wen, Z.L., and Du, J.L. (2012). Reciprocal Regulation between Resting Microglial Dynamics and Neuronal Activity In Vivo. *Dev. Cell* 23, 1189–1202.
- Lindblad, A.S., Lloyd, P.C., Clemons, T.E., Gensler, G.R., Ferris, F.L., Klein, M.L., and Armstrong, J.R. (2009). Change in area of geographic atrophy in the age-related eye disease study: AREDS report number 26. *Arch. Ophthalmol.* 127, 1168–1174.
- Linker, R.A., Mäurer, M., Gaupp, S., Martini, R., Holtmann, B., Giess, R., Rieckmann, P., Lassmann, H., Toyka, K. V., Sendtner, M., et al. (2002). CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: A neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat. Med.* 8, 620–624.
- Liu, S.J., and Zukin, R.S. (2007). Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends Neurosci.* 30, 126–134.
- Liu, X., Albano, R., and Lobner, D. (2014). FGF-2 induces neuronal death through upregulation of system xc⁻. *Brain Res.* 1547, 25–33.
- Liu, Y., Wong, T.P., Aarts, M., Rooyackers, A., Liu, L., Lai, T.W., Wu, D.C., Lu, J., Tymianski, M., Craig, A.M., et al. (2007). NMDA Receptor Subunits Have Differential Roles in Mediating Excitotoxic Neuronal Death Both In Vitro and In Vivo. *J. Neurosci.* 27, 2846–2857.
- Liu, Y., Costa, M., and Gerhardinger, C. (2012). IL-1 β is upregulated in the diabetic retina and retinal vessels: Cell-specific effect of high glucose and IL-1 β autostimulation. *PLoS One* 7, e36949.
- Lobner, D. (2009). Mechanisms of beta-N-methylamino-L-alanine induced neurotoxicity. *Amyotroph. Lateral Scler.* 10, 56–60.
- Lucas, D.R., and Newhouse, J.P. (1957). The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA. Arch. Ophthalmol.* 58, 193–201.
- Luo, C., Chen, M., and Xu, H. (2011). Complement gene expression and regulation in mouse retina and retinal pigment epithelium/choroid. *Mol. Vis.* 17, 1588–1597.
- MacNeil, M.A., and Masland, R.H. (1998). Extreme diversity among amacrine cells: Implications for function. *Neuron* 20, 971–982.
- Magnusson, K.P., Duan, S., Sigurdsson, H., Petursson, H., Yang, Z., Zhao, Y., Bernstein, P.S., Ge, J., Jonasson, F., Stefansson, E., et al. (2006). CFH Y402H confers similar risk of soft drusen and both forms of advanced AMD. *PLoS Med.* 3, 109–114.
- Mahley, R.W., and Rall, S.C. (2000). Apolipoprotein E: Far More Than a Lipid Transport Protein. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 1, 507–537.
- Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., and Huang, Y. (2009). Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J. Lipid Res.* 50, S183–S188.

- Manna, P.P., Dimitry, J., Oldenborg, P.A., and Frazier, W.A. (2005). CD47 augments fas/CD95-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* *280*, 29637–29644.
- Mantovani, A., Sica, A., and Locati, M. (2005). Macrophage polarization comes of age. *Immunity* *23*, 344–346.
- Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol. Cell* *10*, 417–426.
- El Mathari, B., Sene, A., Charles-Messance, H., Vacca, O., Guillonneau, X., Grepin, C., Sennlaub, F., Sahel, J.-A., Rendon, A., and Tadayoni, R. (2015). Dystrophin Dp71 gene deletion induces retinal vascular inflammation and capillary degeneration. *Hum. Mol. Genet.* *24*.
- Mathis, T., Housset, M., Eandi, C., Beguier, F., Touhami, S., Reichman, S., Augustin, S., Gondouin, P., Sahel, J.A., Kodjikian, L., et al. (2017). Activated monocytes resist elimination by retinal pigment epithelium and downregulate their OTX2 expression via TNF- α . *Aging Cell* *16*, 173–182.
- Mckay, G.J., Patterson, C.C., Chakravarthy, U., Dasari, S., Klaver, C.C., Vingerling, J.R., Ho, L., de Jong, P.T.V.M., Fletcher, A.E., Young, I.S., et al. (2011). Evidence of association of APOE with age-related macular degeneration - a pooled analysis of 15 studies. *Hum. Mutat.* *32*, 1407–1416.
- McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., and Hayes, J.D. (2003). Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J. Biol. Chem.* *278*, 21592–21600.
- Medawar, P.B. (1948). Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br. J. Exp. Pathol.* *129*, 58–69.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* *454*, 428–435.
- Menger, N., Pow, D. V, and Wassle, H. (1998). Glycinergic amacrine cells of the rat retina. *J Comp Neurol* *401*, 34–46.
- Miceli, M. V., Liles, M.R., and Newsome, D.A. (1994). Evaluation of oxidative processes in human pigment epithelial cells associated with retinal outer segment phagocytosis. *Exp. Cell Res.* *214*, 242–249.
- Micklisch, S., Lin, Y., Jacob, S., Karlstetter, M., Dannhausen, K., Dasari, P., von der Heide, M., Dahse, H.M., Schmölz, L., Grassmann, F., et al. (2017). Age-related macular degeneration associated polymorphism rs10490924 in ARMS2 results in deficiency of a complement activator. *J. Neuroinflammation* *14*, 4.

- Midena, E., Vujosevic, S., Convento, E., Manfre', A., Cavarzeran, F., and Pitotto, E. (2007). Microperimetry and fundus autofluorescence in patients with early age-related macular degeneration. *Br. J. Ophthalmol.* *91*, 1499–1503.
- Milatovic, D., Gupta, R.C., and Dettbarn, W.D. (2002). Involvement of nitric oxide in kainic acid-induced excitotoxicity in rat brain. *Brain Res.* *957*, 330–337.
- Misra, I., and Griffith, O.W. (1998). Expression and purification of human γ -glutamylcysteine synthetase. *Protein Expr. Purif.* *13*, 268–276.
- Mitamura, Y., Mitamura-Aizawa, S., Katome, T., Naito, T., Hagiwara, A., Kumagai, K., and Yamamoto, S. (2013). Photoreceptor impairment and restoration on optical coherence tomographic image. *J. Ophthalmol.* *2013*, 518170.
- Miyajima-Uchida, H., Hayashi, H., Beppu, R., Kuroki, M., Fukami, M., Arakawa, F., Tomita, Y., and Oshima, K. (2000). Production and accumulation of thrombospondin-1 in human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *41*, 561–567.
- Mizutani, M., Gerhardinger, C., and Lorenzi, M. (1998). Müller cell changes in human diabetic retinopathy. *Diabetes* *47*, 445–449.
- Mizutani, M., Pino, P.A., Saederup, N., Charo, I.F., Ransohoff, R.M., and Cardona, A.E. (2012). The Fractalkine Receptor but Not CCR2 Is Present on Microglia from Embryonic Development throughout Adulthood. *J. Immunol.* *188*, 29–36.
- Moniuszko, M., Bodzenta-Lukaszyk, A., Kowal, K., Lenczewska, D., and Dabrowska, M. (2009). Enhanced frequencies of CD14⁺⁺CD16⁺, but not CD14⁺CD16⁺, peripheral blood monocytes in severe asthmatic patients. *Clin. Immunol.* *130*, 338–346.
- Morcos, Y., Hosie, M.J., Bauer, H.C., and Chan-Ling, T. (2001). Immunolocalization of occludin and claudin-1 to tight junctions in intact CNS vessels of mammalian retina. *J. Neurocytol.* *30*, 107–123.
- Moreno, M.C., Sande, P., Marcos, H.A., de Zavalía, N., Keller Sarmiento, M.I., and Rosenstein, R.E. (2005). Effect of glaucoma on the retinal glutamate/glutamine cycle activity. *FASEB J.* *19*, 1161–1162.
- Murphy, T.H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R.L., and Coyle, J.T. (1989a). Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* *2*, 1547–1558.
- Murphy, T.H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R.L., and Coyle, J.T. (1989b). Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* *2*, 1547–1558.
- Mysona, B., Dun, Y., Duplantier, J., Ganapathy, V., and Smith, S.B. (2009). Effects of hyperglycemia and oxidative stress on the glutamate transporters GLAST and system xc⁻ in mouse retinal Müller glial cells. *Cell Tissue Res.* *335*, 477–488.

- Nagelhus, E.A., Veruki, M.L., Torp, R., Haug, F.M., Laake, J.H., Nielsen, S., Agre, P., and Ottersen, O.P. (1998). Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Müller cells and fibrous astrocytes. *J. Neurosci.* *18*, 2506–2519.
- Nagelhus, E.A., Horio, Y., Inanobe, A., Fujita, A., Haug, F.M., Nielsen, S., Kuhachi, Y., and Ottersen, O.P. (1999). Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* *26*, 47–54.
- Nakazawa, T., Hisatomi, T., Nakazawa, C., Noda, K., Maruyama, K., She, H., Matsubara, A., Miyahara, S., Nakao, S., Yin, Y., et al. (2007). Monocyte chemoattractant protein 1 mediates retinal detachment-induced photoreceptor apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 2425–2430.
- Namekata, K., Harada, C., Kohyama, K., Matsumoto, Y., and Harada, T. (2008). Interleukin-1 Stimulates Glutamate Uptake in Glial Cells by Accelerating Membrane Trafficking of Na⁺/K⁺-ATPase via Actin Depolymerization. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 3273–3280.
- Namekata, K., Harada, C., Guo, X., Kikushima, K., Kimura, A., Fuse, N., Mitamura, Y., Kohyama, K., Matsumoto, Y., Tanaka, K., et al. (2009). Interleukin-1 attenuates normal tension glaucoma-like retinal degeneration in EAAC1-deficient mice. *Neurosci. Lett.* *465*, 160–164.
- Napper, G.A., Pianta, M.J., and Kalloniatis, M. (1999). Reduced glutamate uptake by retinal glial cells under ischemic/hypoxic conditions. *Vis. Neurosci.* *16*, 149–158.
- Narimatsu, T., Ozawa, Y., Miyake, S., Kubota, S., Hirasawa, M., Nagai, N., Shimmura, S., and Tsubota, K. (2013). Disruption of cell-cell junctions and induction of pathological cytokines in the retinal pigment epithelium of light-exposed mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* *54*, 4555–4562.
- Neitemeier, S., Dolga, A.M., Honrath, B., Karuppagounder, S.S., Alim, I., Ratan, R.R., and Culmsee, C. (2016). Inhibition of HIF-prolyl-4-hydroxylases prevents mitochondrial impairment and cell death in a model of neuronal oxytosis. *Cell Death Dis.* *7*, e2214–e2214.
- Netea, M.G., Nold-Petry, C.A., Nold, M.F., Joosten, L.A.B., Opitz, B., Van Der Meer, J.H.M., Van De Veerdonk, F.L., Ferwerda, G., Heinhuis, B., Devesa, I., et al. (2009). Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood* *113*, 2324–2335.
- Neumar, R.W., Xu, Y.A., Gada, H., Guttman, R.P., and Siman, R. (2003). Cross-talk between calpain and caspase proteolytic systems during neuronal apoptosis. *J. Biol. Chem.* *278*, 14162–14167.

Newman, A.M., Gallo, N.B., Hancox, L.S., Miller, N.J., Radeke, C.M., Maloney, M.A., Cooper, J.B., Hageman, G.S., Anderson, D.H., Johnson, L. V, et al. (2012). Systems-level analysis of age-related macular degeneration reveals global biomarkers and phenotype-specific functional networks. *Genome Med.* 4, 16.

Nguyen, T., Sherratt, P.J., and Pickett, C.B. (2003). Regulatory Mechanisms Controlling Gene Expression Mediated By The Antioxidant Response Element. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 233–260.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Neuroscience: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (80-.).* 308, 1314–1318.

Nimmual, A.S., Taylor, L.J., and Bar-Sagi, D. (2003). Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat. Cell Biol.* 5, 236–241.

Nishiyama, K., Sakaguchi, H., Hu, J.G., Bok, D., and Hollyfield, J.G. (2002). Claudin localization in cilia of the retinal pigment epithelium. *Anat. Rec.* 267, 196–203.

Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemannel, M., Schwarz, E., Willnow, T.E., et al. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427, 843–848.

Olney, J.W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science (80-.).* 164, 719–721.

Omri, S., Behar-Cohen, F., De Kozak, Y., Sennlaub, F., Mafra Verissimo, L., Jonet, L., Savoldelli, M., Omri, B., and Crisanti, P. (2011). Microglia/macrophages migrate through retinal epithelium barrier by a transcellular route in diabetic retinopathy: Role of PKC in the Goto Kakizaki rat model. *Am. J. Pathol.* 179, 942–953.

Owsley, C., Jackson, G.R., White, M., Feist, R., and Edwards, D. (2001). Delays in rod-mediated dark adaptation in early age-related maculopathy. *Ophthalmology* 108, 1196–1202.

Ozaki, T., Nakazawa, M., Yamashita, T., Sorimachi, H., Hata, S., Tomita, H., Isago, H., Baba, A., and Ishiguro, S. ichi (2012). Intravitreal injection or topical eye-drop application of a μ -calpain C2L domain peptide protects against photoreceptor cell death in Royal College of Surgeons' rats, a model of retinitis pigmentosa. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1822, 1783–1795.

Pacher, P., Beckman, J.S., and Liaudet, L. (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 87, 315–424.

Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 383–400.

- Park, H.S., Park, J.Y., and Yu, R. (2005). Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF- α and IL-6. *Diabetes Res. Clin. Pract.* *69*, 29–35.
- Peeters, A., Magliano, D.J., Stevens, J., Duncan, B.B., Klein, R., and Wong, T.Y. (2008). Changes in abdominal obesity and age-related macular degeneration: The atherosclerosis risk in communities study. *Arch. Ophthalmol.* *126*, 1554–1560.
- Peri, F., and Nüsslein-Volhard, C. (2008). Live Imaging of Neuronal Degradation by Microglia Reveals a Role for v0-ATPase $\alpha 1$ in Phagosomal Fusion In Vivo. *Cell* *133*, 916–927.
- Piani, D., and Fontana, A. (1994). Involvement of the cystine transport system xc⁻ in the macrophage-induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. *J. Immunol.* *152*, 3578–3585.
- Pignataro, L., Sitaramayya, A., Finnemann, S.C., and Sarthy, V.P. (2005). Nonsynaptic localization of the excitatory amino acid transporter 4 in photoreceptors. *Mol. Cell. Neurosci.* *28*, 440–451.
- Pikuleva, I.A., and Curcio, C.A. (2014). Cholesterol in the retina: The best is yet to come. *Prog. Retin. Eye Res.* *41*, 64–89.
- Platón-Corchado, M., Barcelona, P.F., Jmaeff, S., Marchena, M., Hernández-Pinto, A.M., Hernández-Sánchez, C., Saragovi, H.U., and de la Rosa, E.J. (2017). p75NTR antagonists attenuate photoreceptor cell loss in murine models of retinitis pigmentosa. *Cell Death Dis.* *8*, e2922.
- Poitry, S., Poitry-Yamate, C., Ueberfeld, J., MacLeish, P.R., and Tsacopoulos, M. (2000). Mechanisms of glutamate metabolic signaling in retinal glial (Müller) cells. *J. Neurosci.* *20*, 1809–1821.
- Poulsen, C.F., Simeone, T.A., Maar, T.E., Smith-Swintosky, V., White, H.S., and Schousboe, A. (2004). Modulation by Topiramate of AMPA and Kainate Mediated Calcium Influx in Cultured Cerebral Cortical, Hippocampal and Cerebellar Neurons. *Neurochem. Res.* *29*, 275–282.
- Powner, M.B., Gillies, M.C., Zhu, M., Vevis, K., Hunyor, A.P., and Fruttiger, M. (2013). Loss of Müller's cells and photoreceptors in macular telangiectasia type 2. *Ophthalmology* *120*, 2344–2352.
- Puell, M.C., Barrio, A.R., Palomo-Alvarez, C., Gomez-Sanz, F.J., Clement-Corral, A., and Perez-Carrasco, M.J. (2012). Impaired mesopic visual acuity in eyes with early age-related macular degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* *53*, 7310–7314.
- Pulido, J.E., Pulido, J.S., Erie, J.C., Arroyo, J., Bertram, K., Lu, M.J., and Shippy, S.A. (2007). A role for excitatory amino acids in diabetic eye disease. *Exp. Diabetes Res.* *2007*, 1–7.

- Qin, S., Colin, C., Hinners, I., Gervais, A., Cheret, C., and Mallat, M. (2006). System Xc- and apolipoprotein E expressed by microglia have opposite effects on the neurotoxicity of amyloid-beta peptide 1-40. *J. Neurosci.* *26*, 3345–3356.
- Qiu, Z., Sweeney, D.D., Netzeband, J.G., and Gruol, D.L. (1998). Chronic interleukin-6 alters NMDA receptor-mediated membrane responses and enhances neurotoxicity in developing CNS neurons. *J. Neurosci.* *18*, 10445–10456.
- Raman, I.M., Zhang, S., and Trussell, L.O. (1994). Pathway-specific variants of AMPA receptors and their contribution to neuronal signaling. *J. Neurosci.* *14*, 4998–5010.
- Randolph, G.J., Inaba, K., Robbiani, D.F., Steinman, R.M., and Muller, W.A. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* *11*, 753–761.
- Rauen, T. (2000). Diversity of glutamate transporter expression and function in the mammalian retina. *Amino Acids* *19*, 53–62.
- Rauen, T., and Kanner, B.I. (1994). Localization of the glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retinae. *Neurosci. Lett.* *169*, 137–140.
- Rauen, T., and Wiessner, M. (2000). Fine tuning of glutamate uptake and degradation in glial cells: common transcriptional regulation of GLAST1 and GS. *Neurochem. Int.* *37*, 179–189.
- Rayapudi, S., Schwartz, S.G., Wang, X., and Chavis, P. (2013). Vitamin A and fish oils for retinitis pigmentosa. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, S.G. Schwartz, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), p. CD008428.
- Reed-Geaghan, E.G., Reed, Q.W., Cramer, P.E., and Landreth, G.E. (2010). Deletion of CD14 attenuates Alzheimer's disease pathology by influencing the brain's inflammatory milieu. *J. Neurosci.* *30*, 15369–15373.
- Reichenbach, A., and Bringmann, A. (2013). New functions of müller cells. *Glia* *61*, 651–678.
- Reichenbach, A., Stolzenburg, J.U., Eberhardt, W., Chao, T.I., Dettmer, D., and Hertz, L. (1993). What do retinal Müller (glial) cells do for their neuronal "small siblings"? *J. Chem. Neuroanat.* *6*, 201–213.
- Reif-lehrer, L., Bergenthal, J., and Hanninen, L. (1975). Effects of monosodium glutamate on chick embryo retina in culture. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* *14*, 114–124.
- Rezaie, P., and Male, D. (1999). Colonisation of the developing human brain and spinal cord by microglia: A review. *Microsc. Res. Tech.* *45*, 359–382.
- Riddell, D.R., Zhou, H., Atchison, K., Warwick, H.K., Atkinson, P.J., Jefferson, J., Xu, L., Aschmies, S., Kirksey, Y., Hu, Y., et al. (2008). Impact of Apolipoprotein E (ApoE) Polymorphism on Brain ApoE Levels. *J. Neurosci.* *28*, 11445–11453.

- Riepe, R.E., and Norenburg, M.D. (1977). Müller cell localisation of glutamine synthetase in rat retina. *Nature* 268, 654–655.
- Rizzolo, L.J. (2007). Development and Role of Tight Junctions in the Retinal Pigment Epithelium. *Int. Rev. Cytol.* 258, 195–234.
- Rizzolo, L.J., Peng, S., Luo, Y., and Xiao, W. (2011). Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog. Retin. Eye Res.* 30, 296–323.
- Robles, E., Huttenlocher, A., and Gomez, T.M. (2003). Filopodial calcium transients regulate growth cone motility and guidance through local activation of calpain. *Neuron* 38, 597–609.
- Rofagha, S., Bhisitkul, R.B., Boyer, D.S., Sadda, S.R., and Zhang, K. (2013). Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: A multicenter cohort study (SEVEN-UP). *Ophthalmology* 120, 2292–2299.
- Rosenfeld, P.J., Brown, D.M., Heier, J.S., Boyer, D.S., Kaiser, P.K., Chung, C.Y., and Kim, R.Y. (2006). Ranibizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* 355, 1419–1431.
- Rossi, D.J., Oshima, T., and Attwell, D. (2000). Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403, 316–321.
- Rossi, S., Furlan, R., De Chiara, V., Motta, C., Studer, V., Mori, F., Musella, A., Bergami, A., Muzio, L., Bernardi, G., et al. (2012). Interleukin-1 beta causes synaptic hyperexcitability in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 71, 76–83.
- Rudnicka, A.R., Kapetanakis, V. V., Jarrar, Z., Wathern, A.K., Wormald, R., Fletcher, A.E., Cook, D.G., and Owen, C.G. (2015). Incidence of late-stage age-related macular degeneration in American whites: Systematic review and meta-analysis. *Am. J. Ophthalmol.* 160, 85–93.e3.
- Rungger-Brandle, E., Messerli, J.M., Niemeyer, G., and Eppenberger, H.M. (1993). Confocal Microscopy and Computer-assisted Image Reconstruction of Astrocytes in the Mammalian Retina. *Eur. J. Neurosci.* 5, 1093–1106.
- Rutar, M., Natoli, R., and Provis, J.M. (2012). Small interfering RNA-mediated suppression of Ccl2 in Müller cells attenuates microglial recruitment and photoreceptor death following retinal degeneration. *J. Neuroinflammation* 9, 221.
- Sachdeva, M.M., Cano, M., and Handa, J.T. (2014). Nrf2 signaling is impaired in the aging RPE given an oxidative insult. *Exp. Eye Res.* 119, 111–114.
- Saederup, N., Cardona, A.E., Croft, K., Mizutani, M., Cotleur, A.C., Tsou, C.L., Ransohoff, R.M., and 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.

- Sarks, S.H. (1976). Ageing and degeneration in the macular region: A clinico-pathological study. *Br. J. Ophthalmol.* *60*, 324–341.
- Sarks, J.P., Sarks, S.H., and Killingsworth, M.C. (1988). Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium. *Eye* *2*, 552–577.
- Sarma, J.V., and Ward, P.A. (2011). The complement system. *Cell Tissue Res.* *343*, 227–235.
- Sarthy, V.P., Pignataro, L., Pannicke, T., Weick, M., Reichenbach, A., Harada, T., Tanaka, K., and Marc, R. (2005). Glutamate transport by retinal Müller cells in glutamate/aspartate transporter-knockout mice. *Glia* *49*, 184–196.
- Sasaki, H., Sato, H., Kuriyama-Matsumura, K., Sato, K., Maebara, K., Wang, H., Tamba, M., Itoh, K., Yamamoto, M., and Bannai, S. (2002). Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression. *J. Biol. Chem.* *277*, 44765–44771.
- Sato, H., Takenaka, Y., Fujiwara, K., Yamaguchi, M., Abe, K., and Bannai, S. (1995). Increase in cystine transport activity and glutathione level in mouse peritoneal macrophages exposed to oxidized low-density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *215*, 154–159.
- Sato, H., Tamba, M., Ishii, T., and Bannai, S. (1999). Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J. Biol. Chem.* *274*, 11455–11458.
- Sato, H., Nomura, S., Maebara, K., Sato, K., Tamba, M., and Bannai, S. (2004). Transcriptional control of cystine/glutamate transporter gene by amino acid deprivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *325*, 109–116.
- Savaskan, N.E., Heckel, A., Hahnen, E., Engelhorn, T., Doerfler, A., Ganslandt, O., Nimsky, C., Buchfelder, M., and Eyüpoglu, I.Y. (2008). Small interfering RNA-mediated xCT silencing in gliomas inhibits neurodegeneration and alleviates brain edema. *Nat. Med.* *14*, 629–632.
- Schick, T., Ersoy, L., Lechanteur, Y.T.E., Saksens, N.T.M., Hoyng, C.B., den Hollander, A.I., Kirchhof, B., and Fauser, S. (2016). History of Sunlight Exposure Is a Risk Factor for Age-Related Macular Degeneration. *Retina* *36*, 787–790.
- Schinder, A.F., Olson, E.C., Spitzer, N.C., and Montal, M. (1996). Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* *16*, 6125–6133.
- Schlaf, G., Demberg, T., Beisel, N., Schieferdecker, H.L., and Götze, O. (2001). Expression and regulation of complement factors H and I in rat and human cells: Some critical notes. *Mol. Immunol.* *38*, 231–239.

- Schmitz, D., Frerking, M., and Nicoll, R.A. (2000). Synaptic activation of presynaptic kainate receptors on hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 27, 327–338.
- Schroder, K., and Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell* 140, 821–832.
- Schubert, D., and Piasecki, D. (2001). Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade. *J. Neurosci.* 21, 7455–7462.
- Schuettauf, F., Thaler, S., Bolz, S., Fries, J., Kalbacher, H., Mankowska, A., Zurakowski, D., Zrenner, E., and Rejdak, R. (2007). Alterations of amino acids and glutamate transport in the DBA/2J mouse retina; possible clues to degeneration. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 245, 1157–1168.
- Schultz, K., and Stell, W.K. (1996). Immunocytochemical localization of the high-affinity glutamate transporter, EAAC1, in the retina of representative vertebrate species. *Neurosci. Lett.* 211, 191–194.
- Schuman, S.G., Koreishi, A.F., Farsiu, S., Jung, S. ho, Izatt, J.A., and Toth, C.A. (2009). Photoreceptor Layer Thinning over Drusen in Eyes with Age-Related Macular Degeneration Imaged In Vivo with Spectral-Domain Optical Coherence Tomography. *Ophthalmology* 116, 488–496.e2.
- Schweighofer, B., Testori, J., Sturtzel, C., Sattler, S., Mayer, H., Wagner, O., Bilban, M., and Hofer, E. (2009). The VEGF-induced transcriptional response comprises gene clusters at the crossroad of angiogenesis and inflammation. *Thromb. Haemost.* 102, 544–554.
- Scuderi, S., D'amico, A.G., Federico, C., Saccone, S., Magro, G., Bucolo, C., Drago, F., and D'Agata, V. (2015). Different Retinal Expression Patterns of IL-1 α , IL-1 β , and Their Receptors in a Rat Model of Type 1 STZ-Induced Diabetes. *J. Mol. Neurosci.* 56, 431–439.
- Seddon, J.M., Francis, P.J., George, S., Schultz, D.W., Rosner, B., and Klein, M.L. (2007). Association of CFH Y402H and LOC387715 A69S with progression of age-related macular degeneration. *J. Am. Med. Assoc.* 297, 1793–1800.
- Seiler, A., Schneider, M., Förster, H., Roth, S., Wirth, E.K., Culmsee, C., Plesnila, N., Kremmer, E., Rådmark, O., Wurst, W., et al. (2008). Glutathione Peroxidase 4 Senses and Translates Oxidative Stress into 12/15-Lipoxygenase Dependent- and AIF-Mediated Cell Death. *Cell Metab.* 8, 237–248.
- Seki, M., Tanaka, T., Nawa, H., Usui, T., Fukuchi, T., Ikeda, K., Abe, H., and Takei, N. (2004). Involvement of brain-derived neurotrophic factor in early retinal neuropathy of streptozotocin-induced diabetes in rats: Therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor for dopaminergic amacrine cells. *Diabetes* 53, 2412–2419.
- Selkoe, D.J., and Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* 8, 595–608.

- Sennlaub, F., Auvynet, C., Calippe, B., Lavalette, S., Poupel, L., Hu, S.J., Dominguez, E., Camelo, S., Levy, O., Guyon, E., et al. (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*, 1775–1793.
- Serbina, N. V, Jia, T., Hohl, T.M., and Pamer, E.G. (2008). Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 421–452.
- Shaftel, S.S., Griffin, W.S.T., and Kerry, K.M. (2008). The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: An evolving perspective. *J. Neuroinflammation* *5*, 7.
- Shen, W., Fruttiger, M., Zhu, L., Chung, S.H., Barnett, N.L., Kirk, J.K., Lee, S., Coorey, N.J., Killingsworth, M., Sherman, L.S., et al. (2012). Conditional Muller Cell Ablation Causes Independent Neuronal and Vascular Pathologies in a Novel Transgenic Model. *J. Neurosci.* *32*, 15715–15727.
- Shi, J., He, Y., Hewett, S.J., and Hewett, J.A. (2016). Interleukin 1 β Regulation of the System xc- Substrate-specific Subunit, xCT, in Primary Mouse Astrocytes Involves the RNA-binding Protein HuR. *J. Biol. Chem.* *291*, 1643–1651.
- Shi, X., Semkova, I., Müther, P.S., Dell, S., Kociok, N., and Jousen, A.M. (2006). Inhibition of TNF- α reduces laser-induced choroidal neovascularization. *Exp. Eye Res.* *83*, 1325–1334.
- Shih, A.Y., Johnson, D.A., Wong, G., Kraft, A.D., Jiang, L., Erb, H., Johnson, J.A., and Murphy, T.H. (2003). Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J. Neurosci.* *23*, 3394–3406.
- Shih, A.Y., Erb, H., Sun, X., Toda, S., Kalivas, P.W., and Murphy, T.H. (2006). Cystine/Glutamate Exchange Modulates Glutathione Supply for Neuroprotection from Oxidative Stress and Cell Proliferation. *J. Neurosci.* *26*, 10514–10523.
- Shukla, K., Thomas, A.G., Ferraris, D. V., Hin, N., Sattler, R., Alt, J., Rojas, C., Slusher, B.S., and Tsukamoto, T. (2011). Inhibition of x c - Transporter-mediated cystine uptake by sulfasalazine analogs. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* *21*, 6184–6187.
- Si, Y., Tsou, C.-L., Croft, K., and Charo, I.F. (2010). CCR2 mediates hematopoietic stem and progenitor cell trafficking to sites of inflammation in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 1192–1203.
- Silva, K.C., Rosales, M.A.B., Hamassaki, D.E., Saito, K.C., Faria, A.M., Ribeiro, P.A.O., Lopes de Faria, J.B., and Lopes de Faria, J.M. (2013). Green tea is neuroprotective in diabetic retinopathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* *54*, 1325–1336.
- Simi, A., Tsakiri, N., Wang, P., and Rothwell, N.J. (2007). Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. *Biochem. Soc. Trans.* *35*, 1122–1126.

- Simó, R., and Hernández, C. (2014). Neurodegeneration in the diabetic eye: New insights and therapeutic perspectives. *Trends Endocrinol. Metab.* *25*, 23–33.
- Smoak, K.A., Aloor, J.J., Madenspacher, J., Merrick, B.A., Collins, J.B., Zhu, X., Cavigliolo, G., Oda, M.N., Parks, J.S., and Fessler, M.B. (2010). Myeloid differentiation primary response protein 88 couples reverse cholesterol transport to inflammation. *Cell Metab.* *11*, 493–502.
- Sommer, F., and Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 227–238.
- Sommer, B., Köhler, M., Sprengel, R., and Seeburg, P.H. (1991). RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* *67*, 11–19.
- Squadrito, G.L., Cueto, R., Splenser, A.E., Valavanidis, A., Zhang, H., Uppu, R.M., and Pryor, W.A. (2000). Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Arch. Biochem. Biophys.* *376*, 333–337.
- Starnes, A.C., Huisingh, C., McGwin, G., Sloan, K.R., Ablonczy, Z., Smith, R.T., Curcio, C.A., and Ach, T. (2016). Multi-nucleate retinal pigment epithelium cells of the human macula exhibit a characteristic and highly specific distribution. *Vis. Neurosci.* *33*, e001.
- Steinberg, R.H., Linsenmeier, R.A., and Griff, E.R. (1983). Three light-evoked responses of the retinal pigment epithelium. *Vision Res.* *23*, 1315–1323.
- Strauss, O. (2005). The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiol. Rev.* *85*, 845–881.
- Streilein, J.W., Wilbanks, G., and SW, C. (1992). Immunoregulatory mechanisms of the eye. *Prog. Retin. Eye Res.* *39*, 185–200.
- Streilein, J.W., Ma, N., Wenkel, H., Fong Ng, T., and Zamiri, P. (2002). Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Res.* *42*, 487–495.
- Stuehr, D.J., and Marletta, M.A. (1985). Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *82*, 7738–7742.
- Sullivan, P.M., Han, B., Liu, F., Mace, B.E., Ervin, J.F., Wu, S., Koger, D., Paul, S., and Bales, K.R. (2011). Reduced levels of human apoE4 protein in an animal model of cognitive impairment. *Neurobiol. Aging* *32*, 791–801.
- Sunness, J.S., Rubin, G.S., Applegate, C.A., Bressler, N.M., Marsh, M.J., Hawkins, B.S., and Haselwood, D. (1997). Visual function abnormalities and prognosis in eyes with age-related geographic atrophy of the macula and good visual acuity. *Ophthalmology* *104*, 1677–1691.

- Suzuki, M., Betsuyaku, T., Ito, Y., Nagai, K., Nasuhara, Y., Kaga, K., Kondo, S., and Nishimura, M. (2008). Down-regulated NF-E2-related factor 2 in pulmonary macrophages of aged smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39, 673–682.
- Swaroop, A., Branham, K.E.H., Chen, W., and Abecasis, G. (2007). Genetic susceptibility to age-related macular degeneration: A paradigm for dissecting complex disease traits. *Hum. Mol. Genet.* 16, R174–R182.
- Takahashi, J.L., Giuliani, F., Power, C., Imai, Y., and Yong, V.W. (2003). Interleukin-1 beta promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity. *Ann. Neurol.* 53, 588–595.
- Takaki, J., Fujimori, K., Miura, M., Suzuki, T., Sekino, Y., and Sato, K. (2012). L-glutamate released from activated microglia downregulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: The “collusion” hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* 9, 784.
- Takano, T., Lin, J.H.-C., Arcuino, G., Gao, Q., Yang, J., and Nedergaard, M. (2001). Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nat. Med.* 7, 1010–1015.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805–820.
- Tan, S., Sagara, Y., Liu, Y., Maher, P., and Schubert, D. (1998a). The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J. Cell Biol.* 141, 1423–1432.
- Tan, S., Wood, M., and Maher, P. (1998b). Oxidative stress induces a form of programmed cell death with characteristics of both apoptosis and necrosis in neuronal cells. *J. Neurochem.* 71, 95–105.
- Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Kikuchi, T., et al. (1997). Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276, 1699–1702.
- Tanihara, H., Yoshida, M., Matsumoto, M., and Yoshimura, N. (1993). Identification of transforming growth factor-beta expressed in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 413–419.
- Tao, W., Wen, R., Goddard, M.B., Sherman, S.D., O’Rourke, P.J., Stabila, P.F., Bell, W.J., Dean, B.J., Kauper, K.A., Budz, V.A., et al. (2002). Encapsulated cell-based delivery of CNTF reduces photoreceptor degeneration in animal models of retinitis pigmentosa. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 3292–3298.
- Tarallo, V., Hirano, Y., Gelfand, B.D., Dridi, S., Kerur, N., Kim, Y., Cho, W.G., Kaneko, H., Fowler, B.J., Bogdanovich, S., et al. (2012). DICER1 loss and Alu RNA induce age-related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88. *Cell* 149, 847–859.

Tate, D.J., Miceli, M. V, and Newsome, D.A. (1995). Phagocytosis and H₂O₂ induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *36*, 1271–1279.

Thompson, S.M., Capogna, M., and Scanziani, M. (1993). Presynaptic inhibition in the hippocampus. *Trends Neurosci.* *16*, 222–227.

Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J., et al. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature* *356*, 768–774.

Tout, S., Chan-Ling, T., Holländer, H., and Stone, J. (1993). The role of müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience* *55*, 291–301.

Tsacopoulos, M., and Magistretti, P.J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci.* *16*, 877–885.

Turner, J.D., Bourke, C.D., Meurs, L., Mbow, M., Di??ye, T.N., Mboup, S., Polman, K., and Mountford, A.P. (2014). Circulating CD14^{bright}CD16⁺ “Intermediate” Monocytes Exhibit Enhanced Parasite Pattern Recognition in Human Helminth Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *8*, e2817.

Uehara, T., Nakamura, T., Yao, D., Shi, Z.Q., Gu, Z., Ma, Y., Masliah, E., Nomura, Y., and Lipton, S.A. (2006). S-Nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature* *441*, 513–517.

Vandenbergh, W., Robberecht, W., and Brorson, J.R. (2000). AMPA receptor calcium permeability, GluR2 expression, and selective motoneuron vulnerability. *J. Neurosci.* *20*, 123–132.

Varma, R., Bressler, N.M., Doan, Q. V., Danese, M., Dolan, C.M., Lee, A., and Turpcu, A. (2015). Visual impairment and blindness avoided with ranibizumab in hispanic and non-hispanic whites with diabetic macular edema in the United States. *Ophthalmology* *122*, 982–989.

Vessey, M.P., Villard-Mackintosh, L., and Yeates, D. (1987). Oral contraceptives, cigarette smoking and other factors in relation to arthritis. *Contraception* *35*, 457–464.

Vonsattel, J.P., and DiFiglia, M. (1998). Huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *57*, 369–384.

Vojarova, B., Weyer, C., Hanson, K., Tataranni, P.A., Bogardus, C., and Pratley, R.E. (2001). Circulating Interleukin-6 in Relation to Adiposity, Insulin Action, and Insulin Secretion. *Obes. Res.* *9*, 414–417.

Wakabayashi, Y., Yagihashi, T., Kezuka, J., Muramatsu, D., Usui, M., and Iwasaki, T. (2006). Glutamate levels in aqueous humor of patients with retinal artery occlusion. *Retina* *26*, 432–436.

- Wang, G. (2014). Chromosome 10q26 locus and age-related macular degeneration: A progress update. *Exp. Eye Res.* *119*, 1–7.
- Wang, X., and Michaelis, E.K. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front. Aging Neurosci.* *2*, 12.
- Wang, X.F., and Cynader, M.S. (2000). Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. *J. Neurochem.* *74*, 1434–1442.
- Wang, J.J., Foran, S., Smith, W., and Mitchell, P. (2003). Risk of age-related macular degeneration in eyes with macular drusen or hyperpigmentation: The Blue Mountains Eye Study cohort. *Arch. Ophthalmol.* *121*, 658–663.
- Wang, K., Zhu, X., Zhang, K., Wu, Z., Sun, S., Zhou, F., and Zhu, L. (2016). Neuroprotective Effect of Puerarin on Glutamate-Induced Cytotoxicity in Differentiated Y-79 Cells via Inhibition of ROS Generation and Ca(2+) Influx. *Int. J. Mol. Sci.* *17*, 1109.
- Wang, M., Ma, W., Zhao, L., Fariss, R.N., and Wong, W.T. (2011). Adaptive Müller cell responses to microglial activation mediate neuroprotection and coordinate inflammation in the retina. *J. Neuroinflammation* *8*, 173.
- Ward, M.M., Jobling, A.I., Puthussery, T., Foster, L.E., and Fletcher, E.L. (2004). Localization and expression of the glutamate transporter, excitatory amino acid transporter 4, within astrocytes of the rat retina. *Cell Tissue Res.* *315*, 305–310.
- Watson, J.F., Ho, H., and Greger, I.H. (2017). Synaptic transmission and plasticity require AMPA receptor anchoring via its N-terminal domain. *Elife* *6*.
- Watzke, N., and Grewer, C. (2001). The anion conductance of the glutamate transporter EAAC1 depends on the direction of glutamate transport. *FEBS Lett.* *503*, 121–125.
- Wenkel, H., and Streilein, J.W. (2000). Evidence that retinal pigment epithelium functions as an immune-privileged tissue. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* *41*, 3467–3473.
- Whiteley, S.J., Klassen, H., Coffey, P.J., and Young, M.J. (2001). Photoreceptor rescue after low-dose intravitreal IL-1beta injection in the RCS rat. *Exp Eye Res* *73*, 557–568.
- Wilding, T.J., Zhou, Y., and Huettner, J.E. (2005). Q/R Site Editing Controls Kainate Receptor Inhibition by Membrane Fatty Acids. *J. Neurosci.* *25*, 9470–9478.
- Wong, T.Y., Klein, R., Islam, F.M.A., Cotch, M.F., Folsom, A.R., Klein, B.E.K., Sharrett, A.R., and Shea, S. (2006). Diabetic Retinopathy in a Multi-ethnic Cohort in the United States. *Am. J. Ophthalmol.* *141*, 446–455.e1.
- Wong, W.L., Su, X., Li, X., Cheung, C.M.G., Klein, R., Cheng, C.Y., and Wong, T.Y. (2014). Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Heal.* *2*, e106–e116.

Xu, H., Dawson, R., Crane, I.J., and Liversidge, J. (2005). Leukocyte diapedesis in vivo induces transient loss of tight junction protein at the blood-retina barrier. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 2487–2494.

Xu, H., Chen, M., Manivannan, A., Lois, N., and Forrester, J. V. (2008). Age-dependent accumulation of lipofuscin in perivascular and subretinal microglia in experimental mice. *Aging Cell* 7, 58–68.

Xu, H., Chen, M., and Forrester, J. V. (2009). Para-inflammation in the aging retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 28, 348–368.

Yamasaki, Y., Matsuura, N., Shozuhara, H., Onodera, H., Itoyama, Y., and Kogure, K. (1995). Interleukin-1 as a Pathogenetic Mediator of Ischemic Brain Damage in Rats. *Stroke* 26, 676–681.

Yang, Z., Camp, N.J., Sun, H., Tong, Z., Gibbs, D., Cameron, D.J., Chen, H., Zhao, Y., Pearson, E., Li, X., et al. (2006). A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science* (80-.). 314, 992–993.

Yaspan, B.L., Williams, D.F., Holz, F.G., Regillo, C.D., Li, Z., Dressen, A., Van Lookeren Campagne, M., Le, K.N., Graham, R.R., Beres, T., et al. (2017). Targeting factor D of the alternative complement pathway reduces geographic atrophy progression secondary to age-related macular degeneration. *Sci. Transl. Med.* 9, eaaf1443.

Ye, Z.C., and Sontheimer, H. (1999). Metabotropic glutamate receptor agonists reduce glutamate release from cultured astrocytes. *Glia* 25, 270–81.

Ye, Z.C., Rothstein, J.D., and Sontheimer, H. (1999). Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange. *J. Neurosci.* 19, 10767–10777.

Yu, Y., Reynolds, R., Rosner, B., Daly, M.J., and Seddon, J.M. (2012). Prospective assessment of genetic effects on progression to different stages of age-related macular degeneration using multistate markov models. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 1548–1556.

Yu, Z.F., Bruce-Keller, A.J., Goodman, Y., and Mattson, M.P. (1998). Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo. *J. Neurosci. Res.* 53, 613–625.

Zabel, M.K., Zhao, L., Zhang, Y., Gonzalez, S.R., Ma, W., Wang, X., Fariss, R.N., and Wong, W.T. (2016). Microglial phagocytosis and activation underlying photoreceptor degeneration is regulated by CX3CL1-CX3CR1 signaling in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Glia* 64, 1479–1491.

Zerangue, N., and Kavanaugh, M.P. (1996). Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 383, 634–637.

Zhang, H., Li, Q., Graham, R.K., Slow, E., Hayden, M.R., and Bezprozvanny, I. (2008). Full length mutant huntingtin is required for altered Ca²⁺ signaling and apoptosis of striatal neurons in the YAC mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* *31*, 80–88.

Zhao, H., Roychoudhury, J., Doggett, T.A., Apte, R.S., and Ferguson, T.A. (2013). Age-dependent changes in fasl (CD95L) modulate macrophage function in a model of age-related macular degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* *54*, 5321–5331.

Zhao, L., Zabel, M.K., Wang, X., Ma, W., Shah, P., Fariss, R.N., Qian, H., Parkhurst, C.N., Gan, W.-B., and Wong, W.T. (2015). Microglial phagocytosis of living photoreceptors contributes to inherited retinal degeneration. *EMBO Mol. Med.* *7*, 1179–1197.

Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.J., MacPherson, G., Randolph, G.J., et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* *116*, e74–e80.

Zipfel, P.F., and Skerka, C. (2009). Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 729–740.

ANNEXES

Table des illustrations

Figure 1 : Anatomie de l'œil humain en coupe transversale (Page 14).

Figure 2 : Anatomie de la rétine en coupe sagittale (Page 15).

Figure 3 : Distribution des photorécepteurs dans la rétine humaine (Page 17).

Figure 4 : L'épithélium pigmentaire rétinien (Page 19).

Figure 5 : Structure des photorécepteurs, cônes et bâtonnets (Page 21).

Figure 6 : Le réseau neuronal rétinien (Page 23).

Figure 7 : La cellule gliale de Müller (Page 25).

Figure 8 : Microglie ramifiée et non ramifiée (Page 26).

Figure 9 : Environnement immunosuppresseur de la rétine externe (Page 30).

Figure 10 : La DMLA, une pathologie évolutive (Page 34).

Figure 11 : Accumulation des phagocytes mononucléés dans la DMLA (Page 36).

Figure 12 : Les variants génétiques associés à la DMLA influencent l'inflammation (Page 38).

Figure 13 : Origine et différenciation des monocytes (Page 41).

Figure 14 : Les marqueurs CD14 et CD16 permettent d'identifier les sous-populations de monocytes (Page 42).

Figure 15 : Origine des macrophages chez la souris (Page 43).

Figure 16 : L'accumulation des macrophages inflammatoires est associée à la dégénérescence rétinienne (Page 45).

Figure 17 : Représentation schématique de l'activation du cluster de récepteurs liés à l'immunité innée (IIRC) par l'apolipoprotéine E (Page 47).

Figure 18 : Le facteur H du complément inhibe la résolution de l'inflammation médiée par CD47 (Page 50).

Figure 19 : La production de cytokines inflammatoires par les phagocytes mononucléés induit le dysfonctionnement et la dégénérescence de la rétine externe (Page 51).

Figure 20 : Cycle de transport et stoechiométrie des EAATs (Page 58).

Figure 21 : Représentation schématique du système x_c^- (Page 59).

Figure 22 : Le cycle rétinien du glutamate – Régulations à l'échelle des photorécepteurs (Page 62).

Figure 23 : Schéma représentant les principales voies de signalisation impliquées dans l'excitotoxicité (Page 67).

Figure 24 : Toxicité oxydative du glutamate, la mort neuronale induite par l'inhibition du système x_c^- (Page 70).

Articles complémentaires

Article 3 : *Complement Factor H Inhibits CD47-Mediated Resolution of Inflammation*

Bertrand Calippe*, Sébastien Augustin*, Fanny Beguier, **Hugo Charles-Messance**, Lucie Poupel, Jean-Baptiste Conart, Shulong J. Hu, Sophie Lavalette, Alexandre Fauvet, Julie Rayes, Olivier Levy, William Raoul, Catherine Fitting, Thomas Denèfle, Matthew C. Pickering, Claire Harris, Sylvie Jorieux, Patrick M. Sullivan, José-Alain Sahel, Philippe Karoyan, Przemyslaw Sapieha, Xavier Guillonneau, Emmanuel L. Gautier, et Florian Sennlaub.

Immunity. 2017

Participation à l'article : Investigation et reviewing

Figure 2E : Expérimentation, acquisition et analyse des données

Figures supplémentaires : Participation à l'expérimentation, l'acquisition et l'analyse des données

Complement Factor H Inhibits CD47-Mediated Resolution of Inflammation

Bertrand Calippe,^{1,11} Sebastien Augustin,^{1,11} Fanny Beguier,¹ Hugo Charles-Messance,¹ Lucie Poupel,² Jean-Baptiste Conart,¹ Shulong J. Hu,¹ Sophie Lavalette,¹ Alexandre Fauvet,¹ Julie Rayes,³ Olivier Levy,¹ William Raoul,¹ Catherine Fitting,¹⁰ Thomas Denèfle,⁸ Matthew C. Pickering,⁴ Claire Harris,⁵ Sylvie Jorieux,⁶ Patrick M. Sullivan,⁷ José-Alain Sahel,¹ Philippe Karoyan,⁸ Przemyslaw Sapieha,⁹ Xavier Guillonéau,¹ Emmanuel L. Gautier,² and Florian Sennlaub^{1,12,*}

¹Institut de la Vision, 17 rue Moreau, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, 75012 Paris, France

²Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM UMR-S 1166, Faculté de médecine Pitié-Salpêtrière, 91 Boulevard de l'hôpital, 75013 Paris, France

³Université Paris Descartes, Unité Mixte de Recherche en Santé 872, Centre de Recherche des Cordeliers, 75006 Paris, France

⁴Centre for Complement and Inflammation Research, Department of Medicine, Imperial College, London W12 0NN, UK

⁵Institute of Infection and Immunity, Cardiff University, Cardiff CF10 3XQ, UK

⁶LFB Biotechnologies, 59000 Lille, France

⁷Department of Medicine, Centers for Aging and Geriatric Research Education and Clinical Center, Durham Veteran Affairs Medical Center, Duke University, Durham, NC 27710, USA

⁸Laboratoire des Biomolécules, UMR 7203 and FR 2769, Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France; Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7203 Paris, France; Département de Chimie, École Normale Supérieure, 75005 Paris, France

⁹Department of Ophthalmology, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada

¹⁰Unité Cytokines & Inflammation, Département Infection et Epidémiologie, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

¹¹Co-first author

¹²Lead Contact

*Correspondence: florian.sennlaub@inserm.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.01.006>

SUMMARY

Variants of the *CFH* gene, encoding complement factor H (CFH), show strong association with age-related macular degeneration (AMD), a major cause of blindness. Here, we used murine models of AMD to examine the contribution of CFH to disease etiology. *Cfh* deletion protected the mice from the pathogenic subretinal accumulation of mononuclear phagocytes (MP) that characterize AMD and showed accelerated resolution of inflammation. MP persistence arose secondary to binding of CFH to CD11b, which obstructed the homeostatic elimination of MPs from the subretinal space mediated by thrombospondin-1 (TSP-1) activation of CD47. The AMD-associated CFH(H402) variant markedly increased this inhibitory effect on microglial cells, supporting a causal link to disease etiology. This mechanism is not restricted to the eye, as similar results were observed in a model of acute sterile peritonitis. Pharmacological activation of CD47 accelerated resolution of both subretinal and peritoneal inflammation, with implications for the treatment of chronic inflammatory disease.

INTRODUCTION

Age-related macular degeneration (AMD) is a heritable neuroinflammatory disorder characterized by deposits of lipoproteinaceous debris called large drusen (early AMD), choroidal neovascularization (wet AMD, late form), and an extending lesion of the retinal pigment epithelium (RPE) and photoreceptors (geographic atrophy, GA, late form) (Sarks, 1976). Early AMD afflicts more than 150 million people worldwide, and 10 million people suffer from late AMD (Wong et al., 2014). AMD is strongly associated with common and rare genetic variants of the *CFH* gene, encoding complement factor H (CFH), suggesting a causal role for alterations in CFH expression or function in the pathogenesis of this disease (Fritsche et al., 2014). However, the mechanisms through which these alterations may lead to or contribute to AMD are not well understood.

CFH is an abundant soluble plasma factor composed of 20 short consensus repeat domains (SCR) with important roles in inflammation (Kopp et al., 2012) and coagulation (Rayes et al., 2014) and as an antioxidant (Weismann et al., 2011). The SCR7 domain of CFH binds to glycosaminoglycans (GAG) on cell surfaces, where it inhibits complement activation (Kopp et al., 2012). This domain also allows CFH to bind to myeloid cells via the integrin CD11b (that forms, with CD18, the complement 3 receptor), supporting myeloid cell adhesion and migration, as well as the phagocytosis of microbes and cell debris (DiScipio et al., 1998; Kang et al., 2012; Losse et al., 2010). At inflammatory sites,



Article 4 : *AAV-Mediated Gene Therapy in Dystrophin-Dp71 Deficient Mouse Leads to Blood-Retinal Barrier Restoration and Oedema Reabsorption*

Ophélie Vacca, **Hugo Charles-Messance**, Brahim El Mathari, Abdoulaye Sene, Peggy Barbe, Stéphane Fouquet, Jorge Aragon, Marie Darche, Audrey Giocanti-Aurégan, Michel Pâques, José-Alain Sahel, Ramin Tadayoni, Cecilia Montanez, Deniz Dalkara, et Alvaro Rendon.

Human Molecular Genetics. 2016

Participation à l'article : Investigation et reviewing

Figure 1 : Acquisition et analyse des données

Figure 2 : Participation à l'acquisition et analyse des données

Figure 3 : Participation à l'acquisition et analyse des données

Figure 4A : Acquisition et analyse des données

Figure 4B : Participation à l'acquisition et analyse des données

Figure 5B et C : Participation à l'acquisition et analyse des données

ORIGINAL ARTICLE

AAV-mediated gene therapy in Dystrophin-Dp71 deficient mouse leads to blood-retinal barrier restoration and oedema reabsorption

Ophélie Vacca^{1,2,*}, Hugo Charles-Messance¹, Brahim El Mathari¹, Abdoulaye Sene³, Peggy Barbe¹, Stéphane Fouquet¹, Jorge Aragón^{1,4}, Marie Darche¹, Audrey Giocanti-Aurégan^{1,5}, Michel Paques^{1,6}, José-Alain Sahel^{1,6}, Ramin Tadayoni^{1,7}, Cecilia Montañez⁴, Deniz Dalkara¹ and Alvaro Rendon¹

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, 75012 Paris, France, ²Neuroscience Paris-Saclay Institute (NeuroPSI)–CNRS UMR 9197–Université Paris-Sud, Cognition & Behavior, 91405 Orsay cedex, France, ³Department of Ophthalmology, Therapeutic, Saint Louis, MO 63103, USA, ⁴Department of Genetics & Molecular Biology, CINVESTAV: Research Centre for Advanced Studies, IPN, C.P. 07360 México, ⁵Ophthalmology Department, Avicenne Hospital, 93000 Bobigny, France, ⁶CHNO des Quinze-Vingts, DHU Sight Restore, INSERM-DHOS CIC, 75012 Paris, France and ⁷Ophthalmology Dept, Hôpital Lariboisière, AP-HP, Univ Paris Diderot, 75010 Paris, France

*To whom correspondence should be addressed at: Email: ophelie.vacca@gmail.com

Abstract

Dystrophin-Dp71 being a key membrane cytoskeletal protein, expressed mainly in Müller cells that provide a mechanical link at the Müller cell membrane by direct binding to actin and a transmembrane protein complex. Its absence has been related to blood-retinal barrier (BRB) permeability through delocalization and down-regulation of the AQP4 and Kir4.1 channels (1). We have previously shown that the adeno-associated virus (AAV) variant, ShH10, transduces Müller cells in the Dp71-null mouse retina efficiently and specifically (2,3). Here, we use ShH10 to restore Dp71 expression in Müller cells of Dp71 deficient mouse to study molecular and functional effects of this restoration in an adult mouse displaying retinal permeability. We show that strong and specific expression of exogenous Dp71 in Müller cells leads to correct localization of Dp71 protein restoring all protein interactions in order to re-establish a proper functional BRB and retina homeostasis thus preventing retina from oedema. This study is the basis for the development of new therapeutic strategies in dealing with diseases with BRB breakdown and macular oedema such as diabetic retinopathy (DR).

Received: December 16, 2015. Revised: April 28, 2016. Accepted: May 19, 2016

© The Author 2016. Published by Oxford University Press.

All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

Article 5 : *Dystrophin Dp71 Gene Deletion Induces Retinal Vascular Inflammation and Capillary Degeneration*

Brahim El Mathari, Abdoulaye Sene, **Hugo Charles-Messance**, Ophélie Vacca, Xavier Guillonneau, Claudine Grepin, Florian Sennlaub, José-Alain Sahel, Alvaro Rendon, et Ramin Tadayoni.

Human Molecular Genetics. 2015

Participation à l'article : Investigation

Figure 1 : Participation à l'acquisition et analyse des données

Figure 2 : Participation à l'acquisition et analyse des données

Figure 5A et B : Acquisition et analyse des données

Figure 7A : Acquisition et analyse des données

ORIGINAL ARTICLE

Dystrophin Dp71 gene deletion induces retinal vascular inflammation and capillary degeneration

Brahim El Mathari^{1,2}, Abdoulaye Sene³, Hugo Charles-Messance¹, Ophélie Vacca¹, Xavier Guillonneau¹, Claudine Grepin², Florian Sennlaub¹, José-Alain Sahel^{1,4,5,6}, Alvaro Rendon^{1,†} and Ramin Tadayoni^{1,7,*†}

¹Institut de la Vision/INSERM/UPMC, Univ Paris 06/CNRS/CHNO des Quinze-Vingts, Paris, France, ²Sanofi Fovea—Ophthalmology, Paris, France, ³Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Washington University School of Medicine, Saint Louis, MO, USA, ⁴Fondation Ophtalmologique Adolphe de Rothschild, Paris, France, ⁵Institute of Ophthalmology, University College of London, UK, ⁶Académie des Sciences–Institut de France, Paris, France and ⁷Ophthalmology Department, Hôpital Lariboisière (AP-HP) 2, Université Paris 7, Sorbonne Paris Cité, rue Ambroise Paré, 75010 Paris, France

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 608563347; Fax: +33 149956483; Email: ramin.tadayoni@lrp.aphp.fr

Abstract

We have previously shown that the deletion of the dystrophin Dp71 gene induces a highly permeable blood–retinal barrier (BRB). Given that BRB breakdown is involved in retinal inflammation and the pathophysiology of many blinding eye diseases, here we investigated whether the absence of Dp71 brings out retinal vascular inflammation and vessel loss by using specific Dp71-null mice. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), quantified by quantitative polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay methods, was higher in the retina of Dp71-null mice than in wild-type mice. In contrast, no differences were observed in VEGFR-2 and tumor necrosis factor- α expression. Moreover, mRNA expression of water channel, aquaporin 4 (AQP4) was increased after Dp71 deletion. The Dp71 deletion was also associated with the overexpression of intercellular adhesion molecule 1, which is expressed on endothelial cells surface to recruit leukocytes. Consistent with these findings, the total number of adherent leukocytes per retina, assessed after perfusion with fluorescein isothiocyanate-conjugated concanavalin A, was increased in the absence of Dp71. Finally, a significant increase in capillary degeneration quantified after retinal trypsin digestion was observed in mice lacking Dp71. These data illustrate for the first time that the deletion of Dp71 was associated with retinal vascular inflammation, vascular lesions with increased leukocyte adhesion and capillary degeneration. Thus, dystrophin Dp71 could play a critical role in retinal vascular inflammation disease, and therefore represent a potential therapeutic target.

Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene (2.5 Mb), located on X chromosome, is composed of 79 exons (1,2). Different mutations in this gene induce progressive wasting of skeletal and cardiac muscles in DMD and Becker muscular dystrophy (BMD)

patients (3). One-third of these patients present also cognitive impairments associated with cortical ischemic infarcts (4). In the retina, when measured in dark-adapted (scotopic) conditions, the electroretinogram (ERG) shows reduced amplitude of the b-wave response in 80% of DMD patients (5). Moreover, it

[†] These authors contributed equally to this work.

Received: October 12, 2014. Revised and Accepted: April 9, 2015

© The Author 2015. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Article 6 : *Protection of Glial Müller Cells by Dexamethasone in a Mouse Model of Surgically Induced Blood-Retinal Barrier Breakdown*

Lourdes Siqueiros-Marquez, Romain Bénard, Ophélie Vacca, **Hugo Charles-Messance**, Rodrigo Bolanos-Jimenez, Xavier Guillonneau, Florian Sennlaub, Cecilia Montanez, José-Alain Sahel, Alvaro Rendon, Ramin Tadayoni, et Audrey Giocanti-Aurégan.

Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2017

Participation à l'article : Investigation et reviewing

Figure 2B : Participation à l'acquisition et analyse des données

Figure 6F : Acquisition et analyse des données

Protection of Glial Müller Cells by Dexamethasone in a Mouse Model of Surgically Induced Blood–Retinal Barrier Breakdown

Lourdes Siqueiros-Marquez,^{1,2} Romain Bénard,¹ Ophélie Vacca,¹ Hugo Charles-Messance,¹ Rodrigo Bolaños-Jimenez,¹ Xavier Guilloneau,¹ Florian Sennlaub,¹ Cecilia Montañez,² José Alain Sahel,^{1,3,4} Alvaro Rendon,¹ Ramin Tadayoni,^{1,5} and Audrey Giocanti-Aurégan^{1,6}

¹Sorbonne Universités, Pierre et Marie Curie University, University Paris 06, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique Institut de la Vision, Paris, France

²Department of Genetics & Molecular Biology, Research Centre for Advanced Studies, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

³Centre Hospitalier National d'Ophthalmologie des Quinze-Vingts, Département Hospitalo-Universitaire (DHU) Sight Restore, INSERM-Direction de l'Hospitalisation et de la Direction des Soins Centre d'Investigation Clinique, Paris, France

⁴Fondation Ophthalmologique Adolphe de Rothschild, Département Hospitalo-Universitaire (DHU) Sight Restore, Paris, France

⁵Ophthalmology Department, Hôpital Lariboisière, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP), University Paris 7, DHU Vision and Handicaps–Sorbonne Paris Cité, Paris, France

⁶Ophthalmology Department, Avicenne Hospital, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP), University Paris 13, DHU Vision and Handicaps, Bobigny, France

Correspondence: Audrey Giocanti-Aurégan, Ophthalmology Department, Avicenne Hospital, AP-HP, University Paris 13, DHU Vision and Handicaps, 125 Rue de Stalingrad, Bobigny, France; audrey.giocanti@aphp.fr

Submitted: August 25, 2016

Accepted: January 3, 2017

Citation: Siqueiros-Marquez L, Bénard R, Vacca O, et al. Protection of glial Müller cells by dexamethasone in a mouse model of surgically induced blood–retinal barrier breakdown. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58:876–886. DOI:10.1167/iovs.16-20617

PURPOSE. Breakdown of the inner blood–retinal barrier (iBRB) occurs in many retinal disorders and may cause retinal edema often responsible for vision loss. Dexamethasone is used in clinical practice to restore iBRB. The aim of this study was to characterize the impact of a surgically induced iBRB breakdown on retinal homeostatic changes due to dystrophin Dp71, aquaporin-4 (AQP4), and Kir4.1 alterations in Müller glial cells (MGC) in a mouse model. The protective effect of dexamethasone was assessed in this model. Moreover, retinal explants were used to control MGC exposure to a hypoosmotic solution containing barium.

METHODS. Partial lens surgery was performed in C57BL6/J mice. Dystrophin Dp71, AQP4, and Kir4.1 expression was analyzed by quantitative RT-PCR, Western blot, and immunohistochemistry. Twenty-four hours after surgery, mice received a single intravitreal injection of dexamethasone or of vehicle.

RESULTS. After partial lens surgery, iBRB permeability increased while Dp71 and AQP4 were downregulated and Kir4.1 was delocalized. These effects were partially prevented by dexamethasone injection. In the retinal explant model, MGC were swollen and Dp71, AQP4, and Kir4.1 were downregulated after exposure to a hypoosmotic solution containing barium, but not in the presence of dexamethasone. Heat shock factor protein 1 (HSF1) was overexpressed in dexamethasone-treated retinas.

CONCLUSIONS. Partial lens surgery induces iBRB breakdown and molecular changes in MGC, including a downregulation of Dp71 and AQP4 and the delocalization of Kir4.1. Dexamethasone seems to protect retina from these molecular changes by upregulating HSF1.

Keywords: blood-retinal barrier, retinal edema, Irvine Gass syndrome, dystrophin Dp71 mouse model, ocular surgery, macular edema, dexamethasone

Müller glial cells (MGC) and astrocytes participate in the formation and maintenance of the inner blood–retinal barrier (iBRB), which is required for a normal vision. Transport processes and tight junctions between the vascular endothelial cells composing the iBRB regulate the flow of ions, nutrients, water, and toxic molecules between the retina and vessels to preserve the proper balance necessary for neuronal function.¹ The loss of iBRB alters the balance of fluids between retinal tissues and retinal vessels. It may cause retinal edema with intraretinal fluid accumulation that may be partially compensated by the continuous fluid reabsorption by MGC² and the retinal pigment epithelium.³

Müller glial cells are the predominant type of glial cells in the vertebrate retina, and they regulate retinal extracellular

ionic homeostasis^{4,5} through cooperation between the rectifying potassium channel Kir4.1^{6,7} and the selective water transport protein, aquaporin-4 (AQP4). In normal mouse retina, AQP4 and Kir4.1 are strongly expressed in MGC and mainly localized at MGC endfeet and in processes surrounding the blood vessels. In many retinal diseases, including diabetic retinopathy, retinal vein occlusion, and retinal detachment with iBRB breakdown, the expression and distribution of these channels are altered in MGC.^{8–11} Another important function of MGC is the uptake of neurotransmitters supporting the synaptic activity. A MGC is a neurotransmitter recycler whose neuroprotective effect prevents retinal neurons from the long-lasting toxicity of neurotransmitters.^{12,13} These phenomena are



Article 7 : *Chronic Exposure to Tumor Necrosis Factor Induces Retinal Pigment Epithelium Cell Dedifferentiation*

Sara Touhami, Fanny Beguier, Sébastien Augustin, Hugo Charles-Messance, Emeline Nandrot, Sacha Reichmann, Olivier Goureau, José-Alain Sahel, Xavier Guillonneau, Bahram Bodaghi et Florian Sennlaub

(Accepté dans **Journal of Neuroinflammation**).

Résumé :

La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA) est la première cause de cécité légale dans les pays industrialisés chez les personnes âgées. L'atrophie géographique – l'une des formes tardives de la DMLA - est caractérisée par la perte de l'épithélium pigmentaire et la dégénérescence des photorécepteurs. Nous avons montré précédemment que dans l'atrophie géographique, les phagocytes mononucléés (PMs) s'accumulent dans l'espace sous-rétinien, et induisent la dégénérescence rétinienne via la production d'IL-1 β . Dans un premier temps, nous montrons que la présence de PMs sous-rétiniens est associée à la perte des bâtonnets et la dégénérescence des segments de cônes dans la zone de transition de patients atrophiques. Nous montrons ensuite dans différents modèles *in vivo* et *ex vivo* que les macrophages recapitulent ces effets, et qu'IL-1 β est nécessaire à la perte des segments externes des cônes induite par les PMs. Dans un deuxième temps, nos résultats montrent qu'IL-1 β induit indirectement la mort des bâtonnets, en perturbant l'homéostasie rétinienne du glutamate. L'inhibition des récepteurs glutamatergiques pour prévenir l'excitotoxicité du glutamate, ou la supplémentation en cystine favorisant la restauration de la machinerie neuronale antioxydante, permettent de protéger les bâtonnets de la toxicité induite par IL-1 β . L'ensemble de nos résultats démontre le rôle joué par IL-1 β dans la dégénérescence des segments de cônes et la perte des bâtonnets dans l'inflammation sous-rétinienne. Cette étude permettra la mise au point de thérapies innovantes, afin de lutter contre la forme atrophique de la DMLA, pour laquelle il n'existe actuellement aucun traitement.

Mots clés: Dégénérescence maculaire liée à l'âge, rétine, phagocytes mononucléés, IL-1 β , photorécepteurs, glutamate

Role of IL-1 β in photoreceptor degeneration associated with Age-related Macular Degeneration

Abstract:

In geographic atrophy (GA), one of the late forms of Age-related Macular Degeneration (AMD), an extending atrophic zone forms, characterized by the loss of retinal pigment epithelium and photoreceptor degeneration. Subretinal mononuclear phagocytes (MPs) accumulate in GA, and are associated with IL-1 β -dependent retinal degeneration. First, we confirmed that subretinal accumulation of MPs is associated with rod degeneration and cone segment loss in the transitional zone in GA human samples. Using *ex vivo* and *in vivo* models, we then demonstrated that MPs-derived IL-1 β leads to severe cone segment degeneration. Therefore, inhibiting subretinal MP accumulation or IL-1 β might protect the cone segment, and help preserve high acuity daytime vision in conditions characterized by subretinal inflammation. Second, we showed that IL-1 β effect on rod degeneration is indirect, and mediated by glutamate. Our results indicate that IL-1 β impairs Müller glial cells glutamate recycling, and subsequently leads to the extracellular increase in glutamate content. Inhibiting glutamate receptors to prevent excitotoxicity, or exogenous cystine supplementation to supply antioxidant metabolism, are sufficient to protect rods from IL-1 β -induced neurotoxicity. Our results provide new perspectives to treat pathologies associated with subretinal inflammation such as late AMD. Our results collectively demonstrated that MP-derived IL-1 β induces cone segment loss, and glutamate homeostasis disruption associated with rod degeneration. This study will help with the development of new therapeutic strategies in dealing with inflammatory retinal pathologies as geographic atrophy.

Keywords: Age-related macular degeneration, retina, mononuclear phagocytes, IL-1 β , photoreceptors, glutamate

Sorbonne Université

Ecole doctorale 394 : Physiologie, Physiopathologie & Thérapeutique
Institut de la Vision

Rôle de l'interleukine - 1 β dans la dégénérescence des photorécepteurs associée à la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age

Présentée par

Hugo CHARLES-MESSANCE

Thèse de Doctorat

Présentée et soutenue publiquement le lundi 26 mars 2018

Jury

Pr Isabelle AUDO
Dr Etienne AUDINAT
Dr Stéphane HUNOT
Dr Sarah DOYLE
Dr Muriel PERRON
Pr Ramin TADAYONI
Dr Xavier GUILLONNEAU

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Directeur de Thèse
Encadrant

Il n'est pas question de livrer le monde aux assassins d'aube.
Aimé Césaire

Table des matières

INTRODUCTION	10
I) L'œil et la rétine	11
1.1) Organisation générale de l'œil	11
1.1.1) Généralités	11
1.1.2) Les trois tuniques de l'œil	11
1.1.3) Organisation antéro-postérieure de l'œil	12
1.1.3.1) Le segment antérieur	12
1.1.3.2) Le segment postérieur	14
1.2) La rétine	14
1.2.1) Structure & particularités	14
1.2.1.1) Fonction	14
1.2.1.2) Organisation antéro-postérieure rétinienne	14
1.2.1.3) Organisation centre-périphérie : macula et fovéa	16
1.2.2) Histologie de la rétine	16
1.2.2.1) La rétine pigmentaire	16
1.2.2.2) La rétine neurosensorielle	19
1.2.2.2.1) Les neurones	19
1.2.2.2.1.1) Les photorécepteurs	19
1.2.2.2.1.2) Les autres neurones rétiniens	21
1.2.2.2.2) Les cellules gliales de la rétine	22
1.2.2.2.3.1) Les cellules macrogliales	22
1.2.2.2.3.2) Les microglies résidentes	24
1.2.2.3) Le réseau vasculaire rétinien	25
1.2.3) Le privilège immun	26
1.2.3.1) Barrière hémato-rétinienne	26
1.2.3.2) Immunosuppression	27
1.3) Pathologies les plus fréquentes de la rétine	28
1.3.1) La rétinopathie diabétique	28
1.3.2) La rétinite pigmentaire	29
1.3.3) DMLA	29
II) DMLA & inflammation	30
2.1) Physiopathologie de la DMLA	30
2.1.1) La maculopathie liée à l'âge	30
2.1.2) Les formes tardives de la DMLA	30
2.1.2.1) Forme sèche	30
2.1.2.2) Forme humide	31
2.2) Caractéristiques de la DMLA	31
2.2.1) Statistiques épidémiologiques	31
2.2.2) Caractéristiques et symptômes	33
2.2.3) Les facteurs de risque	34
2.2.3.1) Les facteurs de risque avérés en lien avec l'inflammation	35
2.2.3.2) Les facteurs de risque environnementaux	36
2.2.4) Traitements	37

2.3) Inflammation dans la DMLA.....	38
2.3.1) Le système des phagocytes mononucléés	38
2.3.1.1) Progéniteurs, monocytes et macrophages	38
2.3.1.1.1) Origine des monocytes.....	38
2.3.1.1.2) Les monocytes.....	40
2.3.1.1.3) Les macrophages.....	42
2.3.1.2) Accumulation chronique des macrophages dans la DMLA	42
2.3.1.2.1) Les origines de l'inflammation chronique	42
2.3.1.2.2) Le recrutement des macrophages.....	43
2.3.2) Rôles des facteurs de risques génétiques	44
2.3.2.1) Apolipoprotéine E	44
2.3.2.2) Facteur H du Complément.....	46
2.3.2.3) ARMS2/HTRA1	47
2.3.3) Patho-mécanismes induits par les cytokines inflammatoires.....	48
2.3.3.1) IL-1 β	48
2.3.3.2) TNF- α	49
2.3.3.3) IL-6.....	50
III) Neuro-immunité de la DMLA atrophique.....	51
3.1) Dégénérescence de l'EPR.....	51
3.1.1) Généralités.....	51
3.1.2) Impact du stress oxydant sur l'EPR.....	51
3.1.3) Impact des cytokines inflammatoires, et notamment de l'IL-1 β	52
3.2) Toxicité neuronale induite par les cytokines inflammatoires.....	54
3.2.1) Glutamate	54
3.2.1.1) Généralités sur le glutamate.....	54
3.2.1.1.1) Le cycle du glutamate	54
3.2.1.1.1.1) Transporteurs du glutamate.....	55
3.2.1.1.1.1.1) EAATs.....	55
3.2.1.1.1.1.2) Le système x _c ⁻	57
3.2.1.1.1.2) Müller et photorécepteurs.....	59
3.2.1.1.2) Les récepteurs au glutamate	60
3.2.1.1.2.1) Les récepteurs ionotropiques	61
3.2.1.1.2.2) Les récepteurs métabotropiques.....	62
3.2.1.1.2.3) Les photorécepteurs expriment les récepteurs au glutamate.....	62
3.2.1.2) Toxicité du glutamate.....	63
3.2.1.2.1) Excitotoxicité du glutamate	64
3.2.1.2.1.1) Définition	64
3.2.1.2.1.2) Les acteurs moléculaires	64
3.2.1.2.1.3) Pathologies liées à l'excitotoxicité	66
3.2.1.2.2) Oxytose et système x _c ⁻	68
3.2.1.2.2.1) Stress oxydant	68
3.2.1.2.2.2) Métabolisme du glutathion.....	69
3.2.1.2.2.3) Oxytose.....	69
3.2.1.3) La production d'IL-1 β induit indirectement la mort neuronale	71
3.2.2) Les communications cellulaires rétiniennes.....	73
3.2.2.1) Interactions neuro-gliales rétiniennes.....	73
3.2.2.1.1) Homéostasie du glutamate.....	73
3.2.2.1.2) Les facteurs trophiques	73
3.2.2.2) Interactions entre microglies et cellules de Müller.....	74

OBJECTIFS	76
RESULTATS	79
Article 1 : Les phagocytes mononucléés sous-rétiniens induisent la perte des segments des cônes via IL-1 beta :	80
Article 2 : La production d'IL-1β par les phagocytes mononucléés sous-rétiniens induit la dégénérescence des bâtonnets en dérégulant l'homéostasie rétinienne du glutamate :	98
DISCUSSION & PERSPECTIVES	100
1) Résumé des résultats de la thèse.....	101
2) Considérations générales sur la persistance sous-rétinienne des macrophages	101
2.1) Les polymorphismes génétiques	102
2.2) Exposition à la lumière.....	102
2.3) Stress oxydant.....	103
2.4) Obésité & inflammation systémique.....	103
3) Perspectives thérapeutiques.....	104
3.1) Inhibition des récepteurs au glutamate	104
3.2) Inhibition du système x_c^-	105
3.3) Inhibition du stress oxydant induit par l'excitotoxicité.....	106
3.4) Mode d'application	106
BIBLIOGRAPHIE.....	108
ANNEXES.....	144
Table des illustrations.....	145
Articles complémentaires.....	147

Liste des abréviations

AG – Atrophie géographique
AMPA – α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate
APOE – Apolipoprotéine E
AREs – Adenylate-uridylate-rich elements
ASCT1/2 – Alanine, serine, cysteine transporter 1/2
ATP – Adénosine triphosphate
BDNF – Brain-derived neurotrophic factor
CD – Cellule dendritique
CNQX – 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CNTF – Ciliary neurotrophic factor
BHE – Barrière hémato-encéphalique
BHR – Barrière hémato-rétinienne
CCL2/CCR2 – Chemokine (C-C motif) ligand/receptor 2
CX3CL1/CX3CR1 – Chemokine (C-X3-C motif) ligand/receptor 1
DAMPs – Damage-associated molecular pattern
DMLA – Dégénérescence maculaire liée à l'âge
EAAC1 – Excitatory Amino Acid Carrier-1
EAATs – Excitatory Amino Acid Transporter
EPR – Épithélium pigmentaire rétinien
FasL – Fas-ligand
FDA – Food and Drug Administration
GABA – Acide γ -aminobutyrique
GCL – Glutamate cystéine ligase
GDNF – Glial cell line-derived neurotrophic factor
GLAST – Glutamate/aspartate transporter
GLT-1 – Glutamate transporter-1
GPx4 – Glutathione peroxidase 4
GS – Glutamine Synthétase
GSH – Glutathion
IIRC – Cluster de récepteurs liés à l'immunité innée
ISR – Réponse cellulaire intégrée au stress
IL-1 β – Interleukine-1 β
IL-1RI – Interleukine-1 receptor I
IL-6 – Interleukine-6
LPS – Lipopolysaccharide
MLA – Maculopathie liée à l'âge
NBQX – 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzolquinoxaline-2,3-dione
NGF – Nerve growth factor
NLRP3 – NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NMDA – N-methyl-D-aspartate
NO – Monoxyde d'azote

n/eNOS – Neural/endothelial nitric oxide synthase
Nrf2 – Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
OCT – Optical coherence tomography
OTX2 – Orthodenticle homeobox 2
PAMPs – Pathogen-associated molecular pattern
PDT – Thérapie photo-dynamique
PEDF – Pigment epithelium-derived factor
PMs – Phagocytes mononucléés
RD – Rétinopathie diabétique
RdCVF – Rod-derived cone viability factor
RDH5 – Retinol dehydrogenase 5
RNS – Reactive nitrogen species
ROS – Reactive oxygen species
RP – Rétinite pigmentaire
SNC – Système nerveux central
TGF- β – Transforming growth factor- β
TLR2/4 – Toll-like receptor 2/4
TNF- α – Tumor necrosis factor- α
TrkA/B – Tropomyosin receptor kinase A/B
TSP-1 – Thrombospondine-1
VEGF – Vascular endothelial growth factor
VGLUT – Vesicular glutamate transporter

INTRODUCTION

I) L'œil et la rétine

1.1) Organisation générale de l'œil

1.1.1) Généralités

L'œil est un organe du système visuel, dont la fonction est de réceptionner l'information visuelle, et de la convertir en signaux interprétables par le cerveau, favorisant ainsi l'interaction avec l'environnement. Dans le monde du vivant, on recense plusieurs dizaines de types d'organes visuels, présentant plus ou moins de caractéristiques communes. L'œil des mammifères, tels que l'homme ou la souris, est un œil dit « caméculaire », c'est-à-dire qu'il possède une cavité qui sépare la lentille convergente de l'œil – ou cristallin - de la rétine. L'œil est une structure extrêmement développée, permettant la perception des couleurs, des mouvements, des textures et des formes. Pour saisir la complexité de l'organisation oculaire, il faut considérer et confronter deux approches anatomiques : l'organisation antéro-postérieure de l'œil, ainsi que l'étude des différentes tuniques qui le composent.

1.1.2) Les trois tuniques de l'œil

L'œil est structuré à partir de trois tuniques qui constituent sa paroi : une tunique fibreuse, une tunique vasculaire, et une tunique interne ou rétine (Figure 1).

La tunique fibreuse est la plus périphérique. C'est un tissu souple et résistant, assez peu vascularisé, dont on peut identifier deux segments : (i) la sclère, qui correspond au blanc de l'œil et fournit une accroche aux muscles oculaires, et (ii) la cornée, un tissu transparent situé en position antérieure, protégeant l'œil des agressions physiques et bactériennes.

En dessous, on retrouve la tunique vasculaire ou uvée, qui est composée de trois éléments : (i) la choroïde assurant un support nutritif au tissu rétinien, (ii) les corps ciliaires, et (iii) l'iris.

Enfin, la tunique la plus interne ou rétine, a la particularité d'être confinée au segment postérieur de l'œil, et est directement responsable de la réception des signaux lumineux, et de leur transformation en signaux électriques, interprétables par le cerveau.

Pour mieux se représenter la structure anatomique du bulbe oculaire et identifier les fonctions des différents tissus qui le composent, il est plus intuitif de présenter son organisation spatiale selon un axe antéro-postérieur.

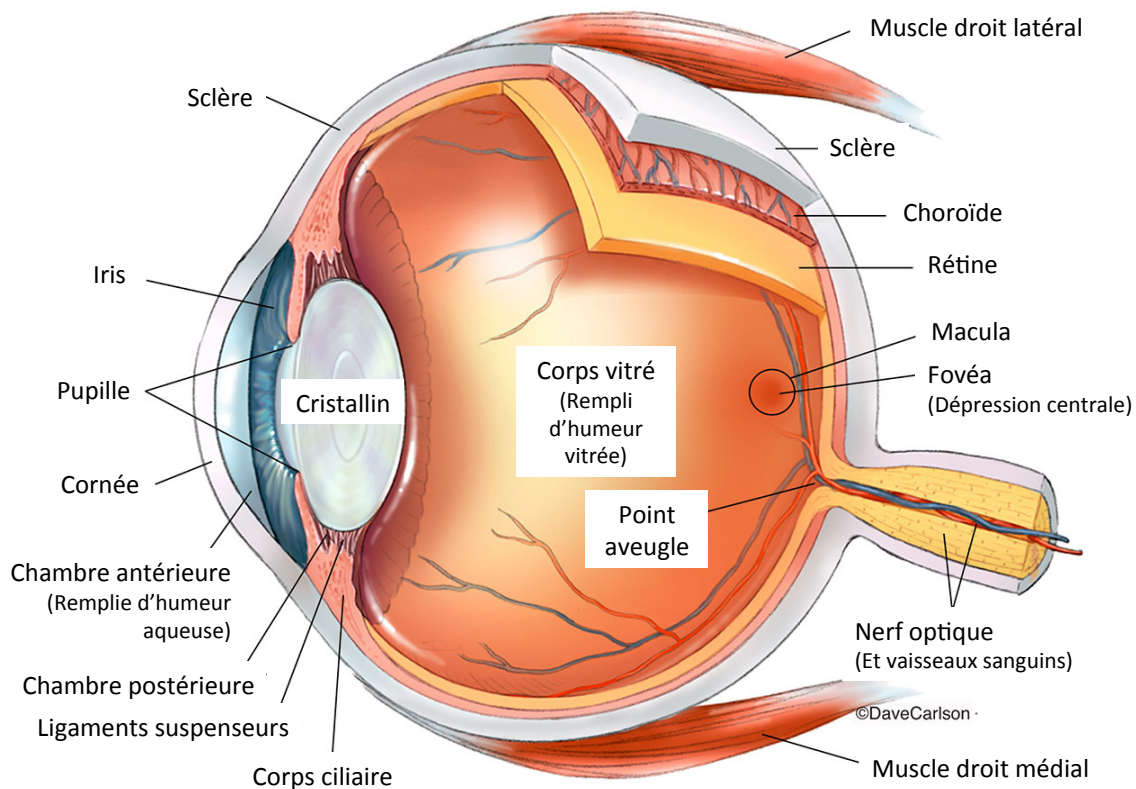


Figure 1 : Anatomie de l'œil humain en coupe transversale.

(©Dave Carlson / CarlsonStockArt.com)

1.1.3) Organisation antéro-postérieure de l'œil

1.1.3.1) Le segment antérieur

L'œil, ou bulbe oculaire, est une structure creuse, avec une forme sphérique légèrement irrégulière. Cette irrégularité est due à un léger renforcement saillant au pôle le plus antérieur de l'œil, qui correspond à la cornée (Figure 1).

La cornée est l'un des très rares tissus à ne pas être vascularisés, afin de ne pas perturber l'entrée de la lumière dans l'œil, et de jouer correctement son rôle de lentille convergente. La cornée survit donc grâce à la diffusion de l'oxygène et des nutriments essentiels à sa survie. L'oxygène provient du liquide lacrymal sécrété à l'extérieur de l'œil, et les nutriments diffusent eux à partir de l'humeur aqueuse. Ce liquide biologique, produit par les procès ciliaires, baigne la chambre antérieure de l'œil, participant de surcroît au maintien de la pression intraoculaire.

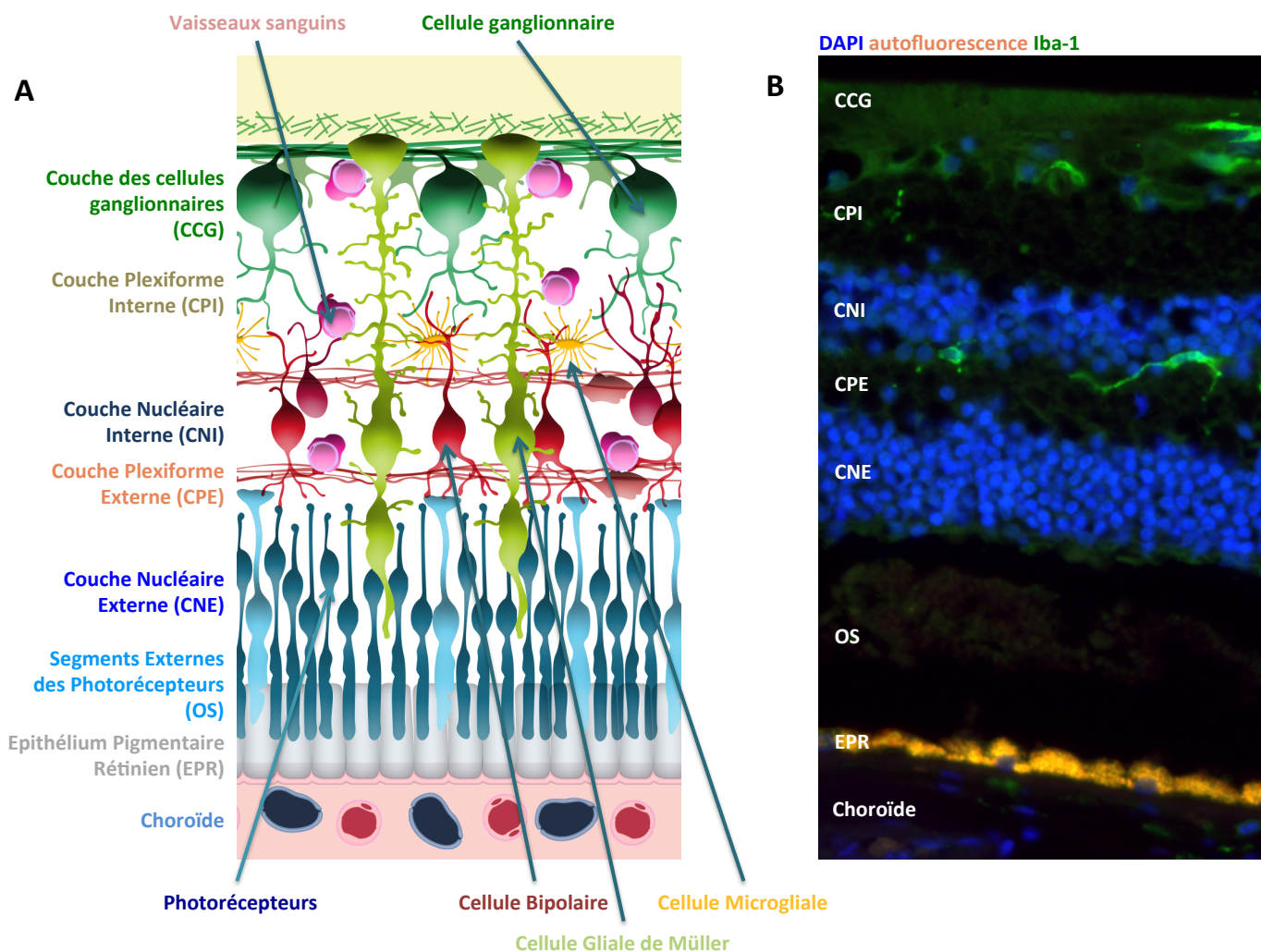


Figure 2 : Anatomie de la rétine en coupe sagittale. (A) Schéma représentant l'organisation de la rétine suivant la disposition des couches qui la composent. La position des différents types cellulaires est représentée à l'aide de flèches. (B) Coupe histologique d'une rétine humaine : les noyaux sont marqués au DAPI (En bleu), les microglies par l'anticorps anti-Iba1 (En vert), et l'EPR auto-fluorescent est représenté en orange.

Dans le segment antérieur de l'œil, entre la cornée et le cristallin, se trouve l'iris. L'iris est un diaphragme musculaire dont la contraction et la dilatation permettent de juguler la quantité de lumière qui traverse la pupille pour aller stimuler la rétine.

La face postérieure du cristallin délimite la séparation entre les segments antérieurs et postérieurs oculaires. Il s'agit de la deuxième lentille convergente de l'œil : le cristallin peut se contracter et ainsi concentrer l'intensité lumineuse sur la rétine, favorisant la perception d'une image nette, même pour un objet très proche de la surface de l'œil – avec une certaine limite. C'est ce qu'on appelle le phénomène d'accommodation.

1.1.3.2) Le segment postérieur

La segment postérieur, bien que supérieur au segment antérieur en terme de volume, présente une organisation anatomique *stricto sensu* plus simple. L'ensemble de cette cavité est occupé par le corps vitré, et ses parois sont tapissées par le tissu nerveux rétinien (Figure 1).

Chez l'homme, le volume du corps vitré est considérable, puisqu'il correspond à 90% du volume oculaire. De même que l'humeur aqueuse dans le segment antérieur de l'œil, le vitré permet de maintenir la pression intraoculaire : la présence de vitré permet aussi de plaquer la rétine à la paroi de l'œil, afin d'en prévenir le décollement, mais sans y adhérer – sauf au niveau du nerf optique. Le corps vitré est une substance gélatineuse transparente majoritairement composée d'eau, et dépourvue de vaisseaux sanguins, afin de favoriser au même titre que la cornée le passage de la lumière. Notons également la présence de hyalocytes, cellules synthétisant certains composés fibreux, comme le collagène ou l'acide hyaluronique.

1.2) La rétine

1.2.1) Structure & particularités

1.2.1.1) Fonction

Après avoir traversé les différentes structures qui composent l'œil, la lumière atteint les segments externes des photorécepteurs et active un mécanisme électrochimique appelé photo-transduction, qui permet de convertir l'information lumineuse en signaux électriques. Ces signaux se propagent dans l'épaisseur de la rétine, *via* les cellules bipolaires puis les cellules ganglionnaires pour ensuite rejoindre les aires visuelles du cerveau. L'intégration de ces signaux est modulée grâce à un système complexe d'interactions neuronales, permettant la formation d'une image précise au niveau du cortex visuel.

1.2.1.2) Organisation antéro-postérieure rétinienne

La rétine est le tissu nerveux directement responsable de la réception et de la conversion de l'information lumineuse en signaux électriques. Elle présente une organisation stratifiée, avec trois couches nucléaires séparées par deux couches plexiformes intermédiaires. La partie de la rétine en contact avec le corps vitré - vers le centre de l'œil - correspond à la rétine interne, et la partie en contact avec l'épithélium pigmentaire est la rétine externe (Figure 2).

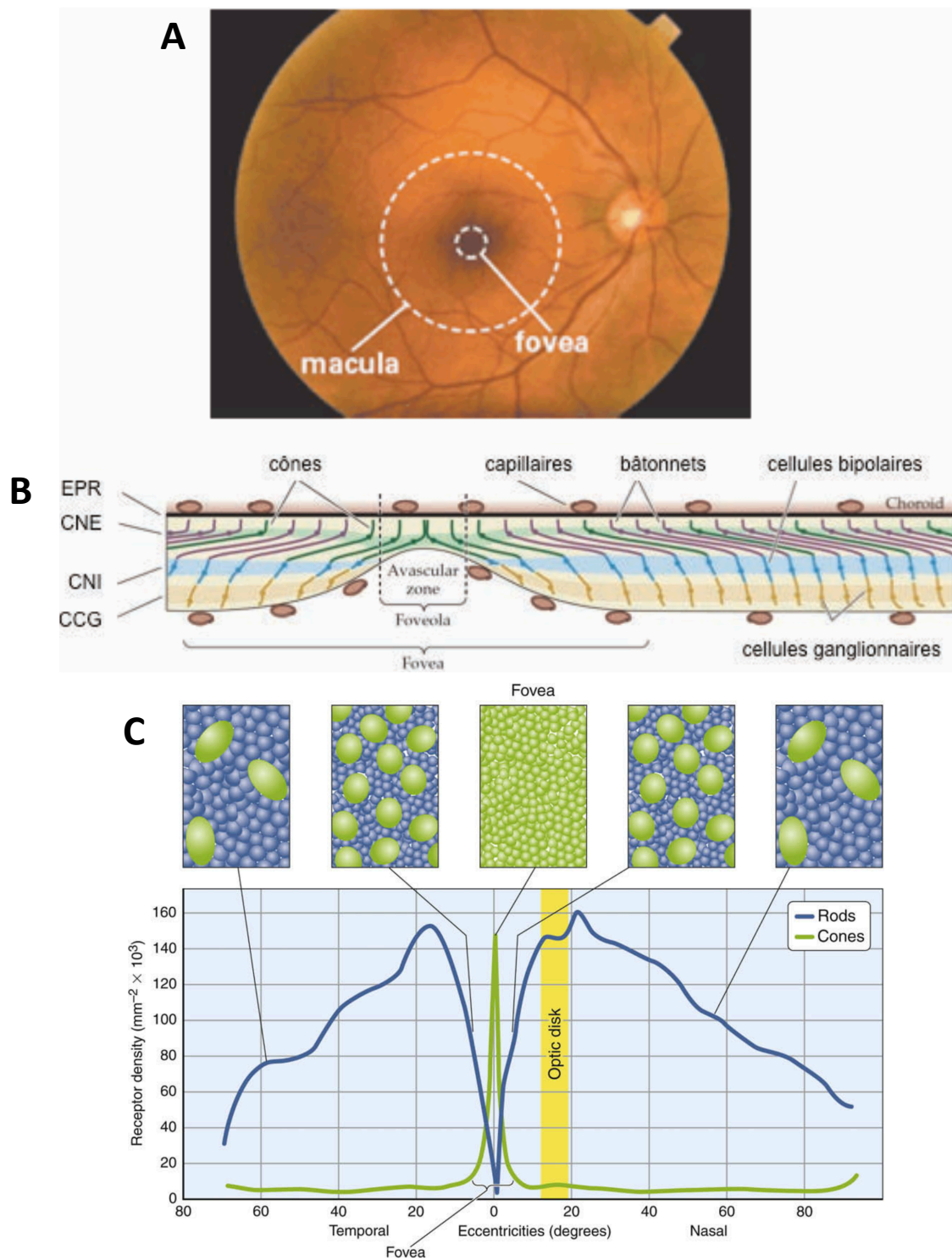


Figure 3 : Distribution des photorécepteurs dans la rétine humaine. (A) Fond d'œil humain montrant la position de la macula et de la fovéa en son centre. (B) Schéma présentant l'amincissement caractéristique de la fovéa, associé à l'absence de vaisseaux sanguins et des couches internes de la rétine, repoussées sur les côtés. (C) Schéma représentant la distribution spatiale des bâtonnets (En bleu) et des cônes (En vert) dans la rétine en fonction de l'excentricité.

(D'après Mustafi et al, 2009, Progress in Retinal and Eye Research)

La couche la plus externe de la rétine est celle des photorécepteurs, avec en premier lieu leurs segments photosensibles, puis vient la couche nucléaire externe, contenant les noyaux des photorécepteurs. Ensuite se déploie la couche plexiforme externe, au sein de laquelle s'établissent les connexions synaptiques entre photorécepteurs et cellules bipolaires, et les cellules horizontales. Dans la couche nucléaire interne qui suit, on trouve les noyaux des neurones secondaires – comme les cellules bipolaires, horizontales et amacrines - ainsi que des cellules gliales de Müller, qui ont la particularité de traverser la rétine de part et d'autre. Au sein de la couche plexiforme interne, les cellules bipolaires établissant leurs connexions synaptiques avec les cellules ganglionnaires, dont les noyaux se trouvent dans la couche nucléaire suivante. Enfin, les axones des cellules ganglionnaires se rassemblent au niveau de la couche des fibres de Henlé pour aller former le nerf optique, qui rejoint ensuite le cerveau (Figure 2).

Par la suite, nous nous focaliserons sur les photorécepteurs et les cellules macrogliales – cellules gliales de Müller : les fonctions des autres cellules de soutien – microglies, astrocytes, vaisseaux sanguins – seront moins développées.

1.2.1.3) Organisation centre-périphérie : macula et fovéa

Chez certains mammifères – comme l'homme ou le primate - se trouve une zone pigmentée au centre de la rétine, facilement identifiable lors de l'examen du fond d'œil : il s'agit de la macula, la zone de vision précise de la rétine (Figure 3 A). Certains rongeurs, comme le rat ou la souris, ne possèdent pas de macula. La macula présente une concentration très importante en cônes, qui sont les photorécepteurs responsables de la vision précise. Anatomiquement parlant, on peut identifier au sein de la macula une fovéa centrale composée exclusivement de cônes (Figure 3 C), encerclée de façon concentrique par la parafovéa et la périfovéa. Au centre de la fovéa se trouve une région encore plus particulière, la dépression fovéolaire ou fovéole. Elle est caractérisée par un amincissement de la rétine, associé à l'absence de vaisseaux sanguins et au décalage des cellules des couches internes repoussées vers la périphérie (Figure 3 B). Cet amincissement favorise l'arrivée de la lumière jusqu'aux photorécepteurs, permettant la formation d'une image extrêmement précise.

1.2.2) Histologie de la rétine

1.2.2.1) La rétine pigmentaire

Les segments externes des photorécepteurs rétiniens sont en contact direct avec l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) sous-jacent, parfois appelé rétine pigmentaire. L'EPR est lui-même séparé de la tunique vasculaire choroïdienne par la membrane de Bruch.

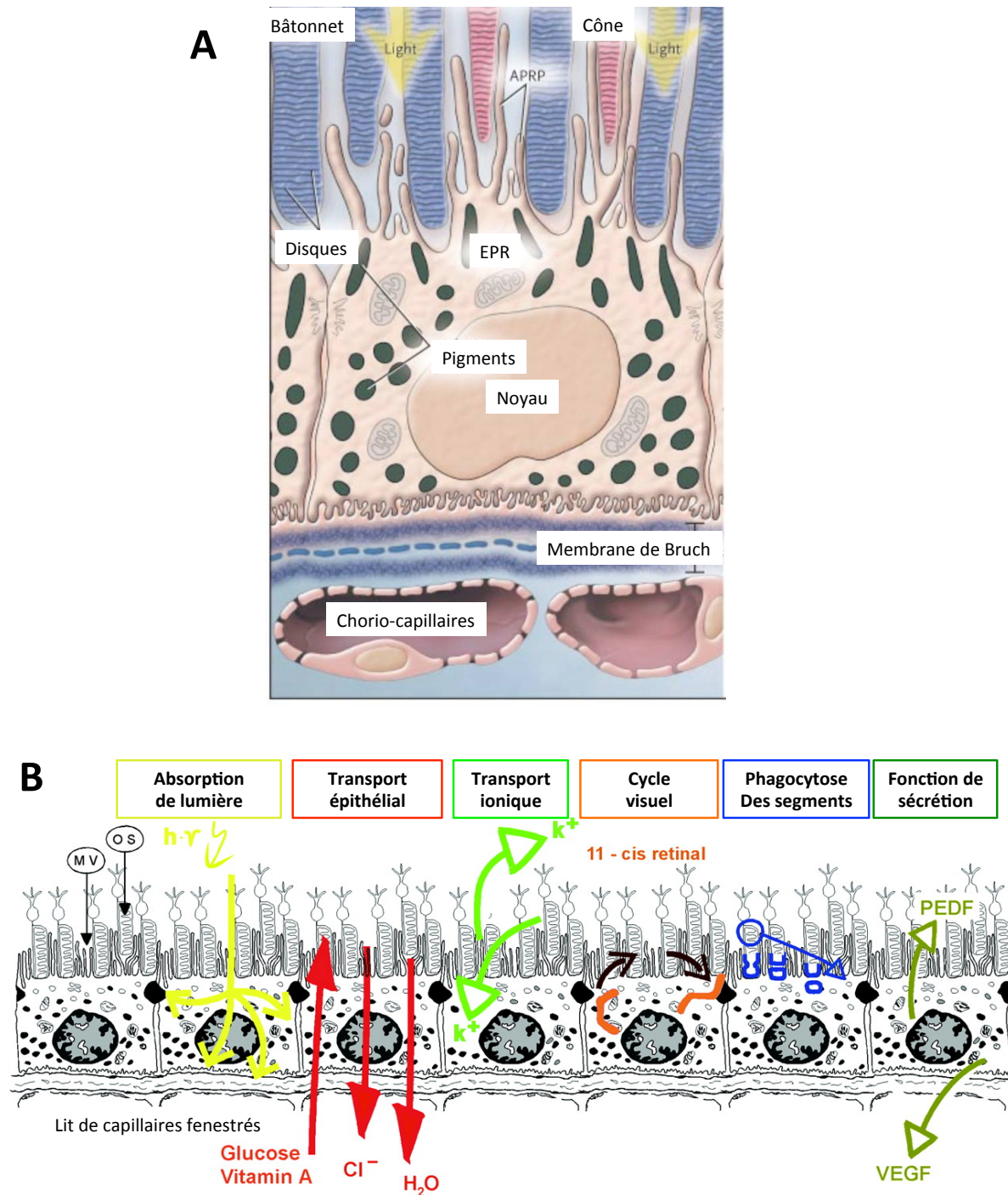


Figure 4 : L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). (A) Schéma représentant la localisation histologique de l'EPR, entre la membrane de Bruch et les segments externes des photorécepteurs, parmi lesquels les cellules de l'EPR étendent leurs microvillosités. (B) Schéma présentant les différentes fonctions de l'EPR.

(D'après Strauss, 2005, Physiol Rev)

L'EPR est une monocouche de cellules pigmentées située en dessous des segments externes des photorécepteurs. La membrane apicale des cellules de l'EPR est composée de nombreuses microvillosités qui étendent leurs prolongements le long des segments

externes (figure 4 A). La membrane basale de l'EPR fait face à la membrane de Bruch. L'EPR joue un rôle vital dans le bon fonctionnement des photorécepteurs en assurant plusieurs fonctions de support (Figure 4 B). Les pigments produits par l'EPR permettent l'absorption de l'excès d'énergie lumineuse concentrée sur la rétine (Boulton and Dayhaw-Barker, 2001). De par son rôle de barrière, l'EPR participe aussi au maintien de l'homéostasie aqueuse et ionique, en contrôlant les échanges entre l'espace sous-rétinien et les capillaires choroïdiens (Dornonville de la Cour, 1993; Hamann, 2002). Ce rôle est particulièrement important, puisque la composition ionique de l'espace sous-rétinien détermine la capacité des photorécepteurs à rester excitables (Steinberg et al., 1983). De la même manière, le transport épithélial géré par l'EPR permet de juguler l'apport en glucose et en vitamines - comme le rétinol - nécessaires au fonctionnement des photorécepteurs. L'EPR participe aussi au maintien de l'excitabilité des photorécepteurs en phagocytant les disques des segments externes qui sont ensuite digérés et assimilés (Finnemann, 2003; Gal et al., 2000), et renouvelés en permanence par les photorécepteurs eux-mêmes. L'EPR recycle aussi certains éléments produits par les photorécepteurs, comme le rétinol. Les photorécepteurs sont en effet incapables de ré-isomériser le tout-*trans*-rétinal, produit de la photo-transduction : c'est pourquoi l'EPR prend aussi en charge le cycle visuel du rétinol. De plus, l'épithélium pigmentaire produit des facteurs de croissance favorisant le maintien de l'intégrité de la paroi des choriocapillaires, et des photorécepteurs. Enfin, l'EPR joue un rôle central dans le maintien du privilège immun en sécrétant des facteurs immunosuppresseurs (Ishida et al., 2003; Streilein et al., 2002). Cet aspect sera traité plus en détail au paragraphe « 1.2.3.2) Immunosuppression ».

La membrane de Bruch, située sous la surface basale de l'EPR, est une fine structure acellulaire pentalaminaire délimitant l'EPR de la choroïde. Elle est composée d'une couche d'élastine, entourée par deux couches de collagène, et cette structure est elle-même délimitée par une membrane basale interne et une membrane basale externe situées de part et d'autre.

La choroïde enfin, est majoritairement constituée de vaisseaux sanguins, de mélanocytes, des macrophages et de fibroblastes. Sa fonction majeure est de fournir la rétine externe - dépourvue de vaisseaux - en oxygène et en nutriments, mais elle participe aussi à la thermorégulation ainsi qu'à l'absorption de lumière. C'est à partir des choriocapillaires - un réseau hautement anastomosé de capillaires fenestrés - situés à proximité de la membrane de Bruch que s'effectue la diffusion de nutriments destinés aux photorécepteurs, très actifs métaboliquement.

1.2.2.2) La rétine neurosensorielle

1.2.2.2.1) Les neurones

1.2.2.2.1.1) Les photorécepteurs

Les photorécepteurs sont les neurones photosensibles situés dans la partie la plus externe de la rétine : ils initient la chaîne visuelle, en convertissant les signaux lumineux en signaux électriques grâce à la photo-transduction. Il existe deux types de photorécepteurs : les cônes, et les bâtonnets (Figure 5). Au niveau de la rétine des mammifères, on dénombre environ dix fois moins de cônes que de bâtonnets. Chez les animaux possédant une macula, leur répartition n'est pas homogène et les cônes sont majoritairement localisés au centre de la rétine, au niveau de la macula, zone d'où les bâtonnets sont pratiquement absents. Au sein de la rétine, les noyaux des cônes sont majoritairement disposés le long d'une couche suivant la membrane limitante externe, alors que les noyaux des bâtonnets sont répartis en une dizaine de couches.

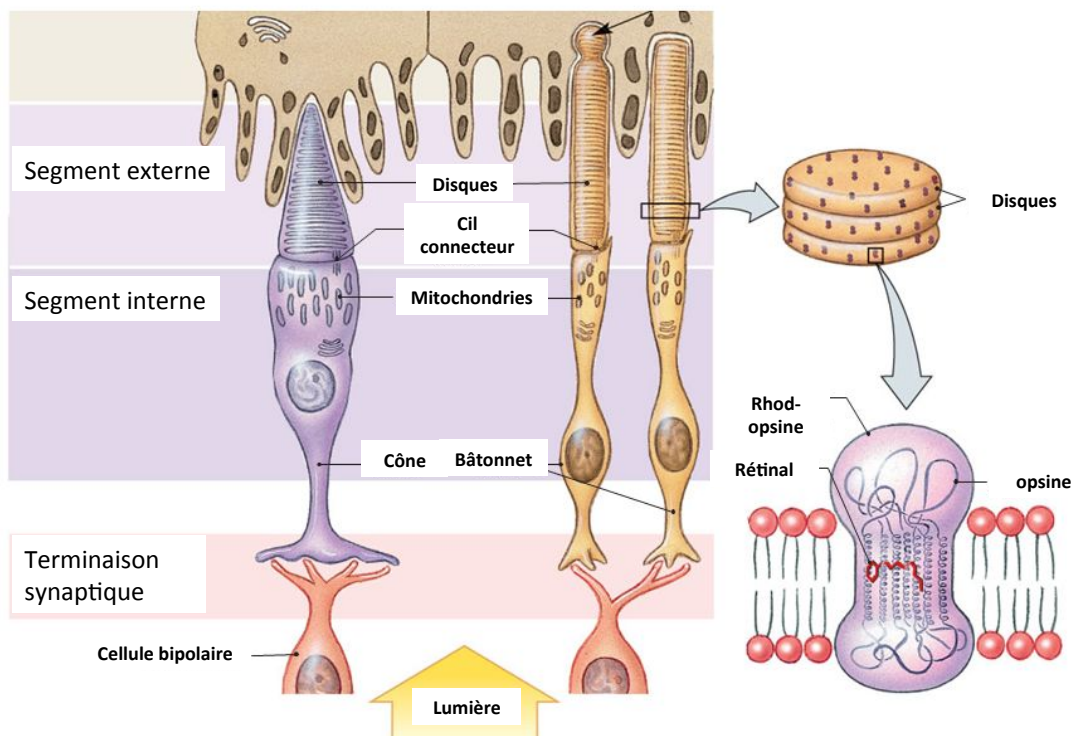


Figure 5 : Structure des photorécepteurs, cônes et bâtonnets.

Les cônes et les bâtonnets ne diffèrent pas seulement par leur distribution, mais aussi par leur forme, et les photo-pigments qu'ils expriment, respectivement opsines et rhodopsines : ces disparités révèlent leurs différentes fonctions. Les cônes interviennent

dans la vision centrale diurne (en conditions photopiques) : ils sont moins sensibles à la lumière que les bâtonnets, mais sont associés à des circuits neuronaux favorisant une haute résolution spatiale. Ces réseaux permettent de percevoir les couleurs, et de discerner les visages ou les lettres. Les bâtonnets interviennent dans la vision périphérique nocturne (en conditions scotopiques) : leur seuil d'excitation est moins élevé que celui des cônes – il suffit d'un seul photon, alors que plus de 100 photons sont nécessaires pour induire une réponse similaire chez les cônes – mais les réseaux neuronaux auxquels ils sont associés ne permettent pas d'atteindre une résolution visuelle aussi élevée.

Les photorécepteurs sont composés (i) d'un segment externe, un empilement de disques – formés à partir de replis membranaires – contenant les pigments visuels, (ii) un segment interne, contenant la machinerie permettant la synthèse d'énergie et d'opsines, et relié au segment externe par un cil connecteur, (iii) un corps cellulaire, et (iv) une dendrite terminée par une synapse, permettant la communication nerveuse avec les neurones secondaires.

C'est l'architecture des segments externes qui confère leurs différences fonctionnelles aux cônes et aux bâtonnets. Chez les bâtonnets, le segment externe est plus long, et est composé d'un empilement de disques, dissociés de la membrane plasmique du cil connecteur. Chez les cônes, plus courts, la série de disques est formée par des évaginations de la membrane plasmique : ils sont donc tous connectés à la membrane qui se prolonge à partir du cil connecteur. Les segments externes étant sollicités en permanence, ils sont continuellement renouvelés grâce à un équilibre entre la phagocytose réalisée par les cellules de l'épithélium pigmentaire sous-jacent, et la croissance au niveau du cil connecteur.

A l'obscurité, la membrane des cônes et des bâtonnets est dépolarisée, et ils libèrent en permanence le neurotransmetteur glutamate au niveau de leur synapse : l'exposition à la lumière entraîne une hyperpolarisation membranaire, et la transmission synaptique est alors interrompue. Le mécanisme qui sous-tend ces régulations est aujourd'hui connu : c'est la phototransduction. Dans les photorécepteurs, le processus de phototransduction peut être décomposé en plusieurs étapes. La première est la photoactivation : lorsque le rétinol-11-*cis* absorbe un photon, il est photo-isomérisé en *trans*-rétinol, ce qui induit une modification de la conformation de l'opsine. Cette modification permet à l'opsine de se lier à la transducine, une protéine G : la liaison entre ces deux protéines entraîne le remplacement d'un GDP par un GTP, et active la sous-unité alpha de la transducine, qui se détache pour activer une phosphodiesterase associée à la membrane. Cette enzyme va à son tour hydrolyser le GMPc, entraînant la fermeture des canaux ioniques : la cellule ainsi hyperpolarisée interrompt alors la libération synaptique de glutamate.

1.2.2.2.1.2) Les autres neurones rétiniens

La cellule bipolaire est le premier type de neurone de projection rétinien : elle établit un relai synaptique entre les photorécepteurs et les cellules ganglionnaires (Figure 6). Les cellules bipolaires jouent un rôle central dans l'intégration du signal nerveux : elles sont en contact avec toutes les autres catégories de neurones rétiniens, et apportent les premières modifications à l'intégration de l'input nerveux. Il existe plus de dix types de cellules bipolaires dans la rétine des mammifères, mais elles sont plus souvent organisées selon le type ON ou OFF de leur réponse électrochimique aux signaux transmis (Hartveit, 1997).

En plus des cellules bipolaires, il existe deux autres familles d'interneurones au niveau de la rétine interne, les cellules horizontales et les cellules amacrines (Figure 6). Les cellules horizontales permettent d'augmenter le contraste visuel. Quand un photorécepteur est éclairé et stimulé, la cellule horizontale a un effet inhibiteur sur les photorécepteurs environnants : ce phénomène d'inhibition latérale permet d'éviter une confusion du signal et intervient dans la détection des mouvements.

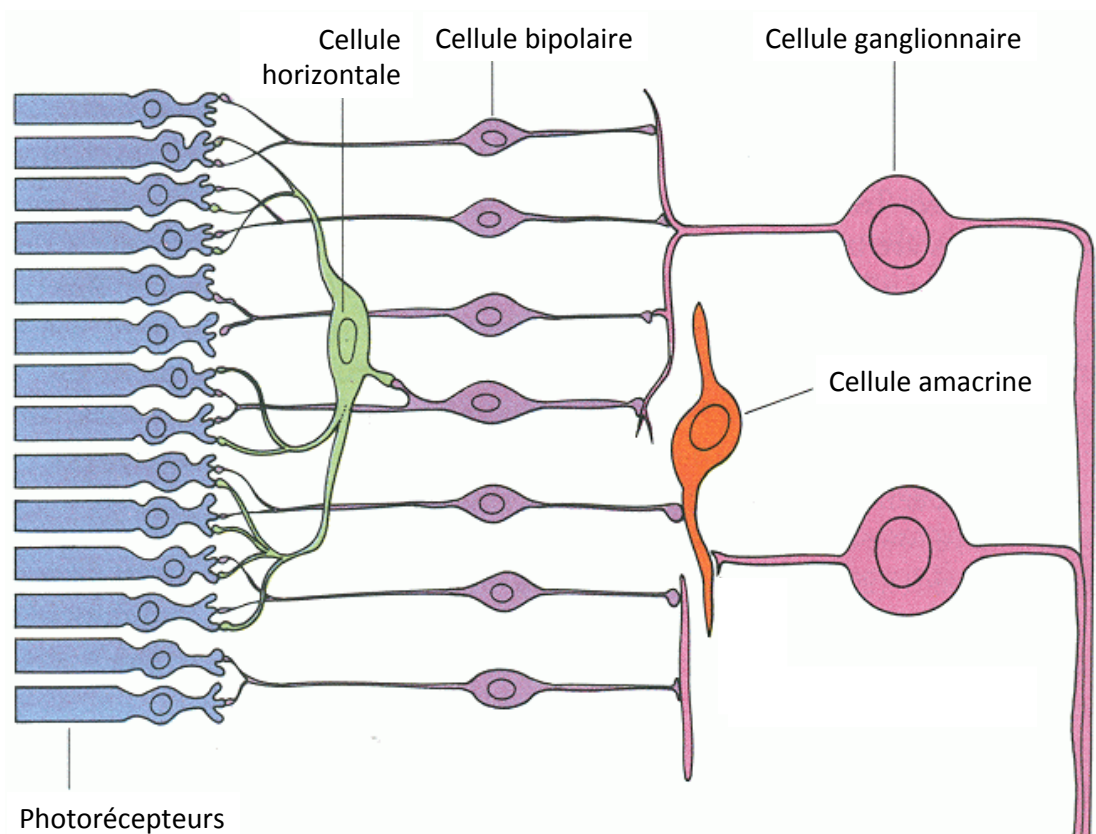


Figure 6 : Le réseau neuronal rétinien. L'influx nerveux se propage des photorécepteurs aux cellules bipolaires, puis aux cellules ganglionnaires, et est modulé par les cellules horizontales et amacrines.

(D'après David Hubel, Harvard University)

Les cellules amacrines établissent des connexions multiples avec les cellules bipolaires et ganglionnaires, notamment de par leur localisation privilégiée au sein de la couche plexiforme interne. Aujourd'hui, entre 20 et 30 types de cellules amacrines (Balasubramanian and Gan, 2014; MacNeil and Masland, 1998) sont référencées. Elles sont différenciées par leur morphologie, et il a été établi que la majorité d'entre elles (85%) établissent des synapses inhibitrices, en produisant des neurotransmetteurs de type GABA ou glycine (Menger et al., 1998). Les cellules amacrines établissent en fait un réseau qui module l'intégration des signaux nerveux provenant des cellules bipolaires, à destination des cellules ganglionnaires : il s'agit des dernières modifications apportées à l'input avant son envoi jusqu'au cerveau.

Après avoir subis des modifications *via* l'activité des interneurons, le signal nerveux atteint la couche des cellules ganglionnaires rétinienne, dont il existe plus de 30 types. Leurs noyaux sont tous localisés dans cette couche, et les cellules ganglionnaires disposent d'une arborescence de dendrites réparties dans la plexiforme interne leur permettant de collecter le signal nerveux, ainsi que d'un axone qui se prolonge jusqu'au cerveau, *via* les nerfs optiques.

1.2.2.2.2) Les cellules gliales de la rétine

1.2.2.2.3.1) Les cellules macrogliales

La cellule gliale de Müller compte pour 90% de la glie rétinienne, et en est donc un composant majeur : elle appartient à la catégorie des cellules gliales radiaires, au même titre que la cellule de Bergmann que l'on retrouve dans le cervelet. Les cellules de Müller ont donc la particularité d'être orientées de manière radiale, et traversent la rétine de part en part (Figure 7). Elles étendent leurs prolongements depuis la couche des cellules ganglionnaires – à la frontière de la cavité vitréenne – jusqu'à la couche nucléaire externe – là où commence l'espace sous-rétinien. Les cellules de Müller jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement physiologique de la rétine, et sont très souvent impliquées dans les pathologies rétinienne neuro-dégénératives, comme la rétinopathie diabétique (Gerhardinger et al., 2005), le décollement de rétine (Francke et al., 2001) ou la télangiectasie maculaire de type II (Powner et al., 2013). De par leur position privilégiée, c'est-à-dire en enroulant leurs prolongements cytoplasmiques autour des capillaires sanguins et des neurones, les cellules de Müller contribuent au maintien de l'homéostasie rétinienne à différents niveaux (Figure 7). Tout d'abord, elles régulent les flux aqueux et ioniques (Nagelhus et al., 1998, 1999) : le transporteur potassique Kir4.1 et le canal aqueux AQP4 jouent un rôle majeur dans la régulation des échanges osmotiques (Kofuji et al., 2000). Les cellules de Müller participent au transport des nutriments, et à l'évacuation des déchets métaboliques (Tsacopoulos and Magistretti, 1996), et au maintien de la barrière hémato-rétinienne (Tout et al., 1993).

De plus, les cellules gliales de Müller favorisent la survie des neurones via la production de facteurs neurotrophiques : ainsi, l'ablation conditionnelle des cellules de Müller induit l'apoptose des photorécepteurs, mais cet effet peut être inhibé par l'ajout de facteurs neurotrophiques exogènes (Shen et al., 2012). Enfin, elles jouent un rôle indispensable dans la transmission synaptique en participant au recyclage des neurotransmetteurs (Reichenbach and Bringmann, 2013). Les cellules de Müller ont à leur disposition tout un arsenal de transporteurs permettant la capture et la libération de glutamate. L'implication de ces transporteurs en conditions pathologiques sera traitée dans le chapitre « 3.2.1.2.) Toxicité du glutamate ».

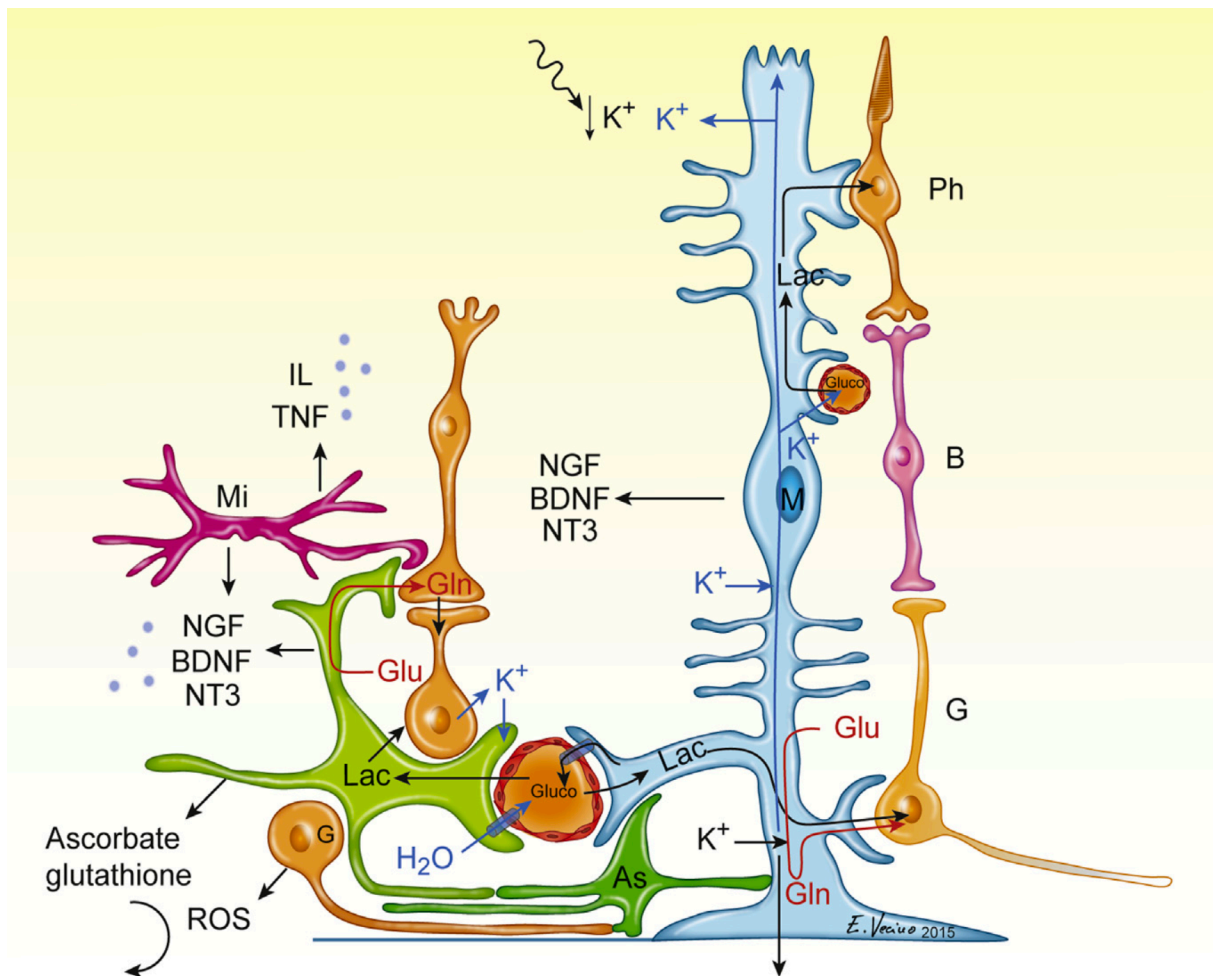


Figure 7 : La cellule gliale de Müller. Schéma d'une cellule gliale de Müller (En bleu), mettant en évidence les nombreuses interactions établies avec les autres cellules rétinienne, et qui favorisent son rôle central de régulateur homéostatique. Mi : microglie. As : astrocyte. G : cellule ganglionnaire. Ph : photorécepteur. B : cellule bipolaire. M : cellule gliale de Müller. Glu : glutamate. Gln : glutamine.

(D'après Vecino et al, 2016, Progress in Retinal and Eye Reseach)

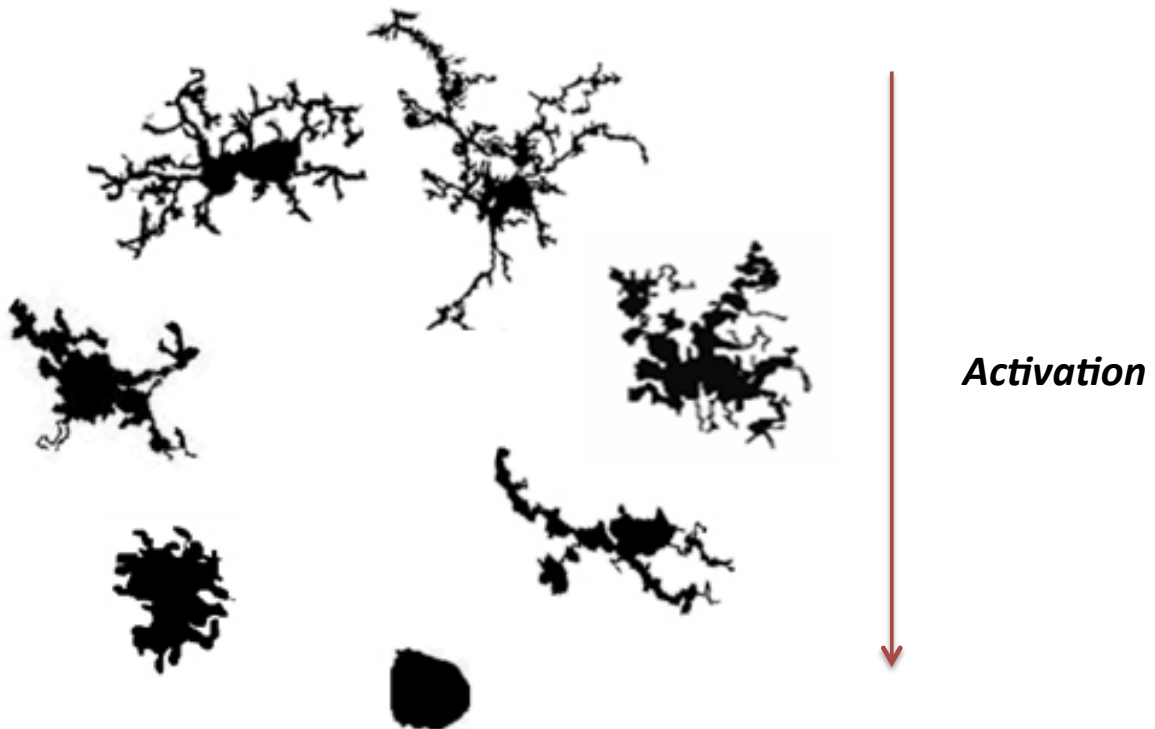
Les astrocytes – qui tirent leur nom de leur forme stellaire – sont majoritairement localisés dans la couche la plus interne de la rétine. Leur distribution est corrélée avec la présence et la distribution des vaisseaux sanguins rétiniens. Les cellules astrocytaires étendent leurs prolongements autour des vaisseaux sanguins et des axones des

neurones de la couche ganglionnaire : leur distribution dépend donc aussi de la densité des fibres nerveuses (Rungger-Brandle et al., 1993). Comme dans le cerveau, les astrocytes rétiens participent au maintien de la barrière hémato-rétinienne, et au support neurotrophique des neurones.

1.2.2.2.3.2) Les microglies résidentes

La microglie est le macrophage résident du système nerveux central, et appartient au système des phagocytes mononucléés. Il s'agit d'une cellule immunitaire modulant la réponse inflammatoire en cas d'infection, mais qui joue aussi un rôle essentiel dans la surveillance (Nimmerjahn et al., 2005) via ses nombreux prolongements cytoplasmiques (Davalos et al., 2005), et dans le maintien de l'homéostasie rétinienne.

Microglie ramifiée, au « repos » (Etat senseur)



Microglie non-ramifiée ou amiboïde, activée

Figure 8 : Microglie ramifiée et non-ramifiée. Schéma présentant les différentes morphologies de microglies en fonction de leur niveau d'activation.

(D'après Colton et al, 2000, Ann NY Acad Sci)

Les microglies colonisent le système nerveux central dès le développement au cours de l'embryogénèse, à partir de progéniteurs myéloïdes présents dans le sac vitellin (Ginhoux et al., 2010a), et se répandent au sein du tissu en suivant les réseaux neuronaux, vasculaires ou gliaux (Rezaie and Male, 1999). En conditions physiologiques,

les microglies présentent une morphologie caractéristique d'un état dit « quiescent » (Figure 8), mais qui correspond en fait à un rôle de senseur actif. Les microglies adoptent alors une forme extrêmement ramifiée et qui présente des prolongements très mobiles, considérablement différente de leur état dit « activé », où elles présentent une morphologie amiboïde (Davis et al., 1994) (Figure 8). Dans les conditions basales, les microglies sont majoritairement localisées dans les couches les plus internes de la rétine, mais elles peuvent se déplacer dans la couche des photorécepteurs ou l'espace sous-rétinien dans le cadre d'une réponse inflammatoire.

Les microglies interagissent en permanence avec leur environnement, et particulièrement avec les populations neuronales. Le meilleur exemple de ce type d'interaction neurone-glie, est le système CX3CL1/CX3CR1. La fractalkine, ou CX3CL1 est une chimiokine produite par les neurones et présente sous deux formes, soluble ou liée à la membrane (Bazan et al., 1997). Elle se lie au récepteur CX3CR1, qui est un récepteur à sept domaines membranaires couplé à une protéine G et exprimé par les microglies (Jung et al., 2000). L'interaction entre le ligand et son récepteur induit un signal inhibiteur tonique, qui maintient la microglie dans un état non-activé en condition basale, permettant ainsi de prévenir le développement d'une réponse inflammatoire excessive en absence d'atteinte neuronale (Harrison et al., 1998). En absence de CX3CR1, les microglies répondent plus fortement aux stimuli excitateurs, et induisent une toxicité dirigée contre les neurones (Cardona et al., 2006). Cette caractéristique a permis de développer un modèle murin de dégénérescence maculaire liée à l'âge à partir de souris déficientes en *Cx3cr1*, associé à l'accumulation de macrophages sous-rétiniens (Combadière et al., 2007).

1.2.2.3) Le réseau vasculaire rétinien

La rétine est l'un des tissus du corps humain les plus actifs métaboliquement. Chez les mammifères, la microcirculation rétinienne repose sur un réseau vasculaire organisé en trois couches de vaisseaux présents dans la rétine interne, avec un plexus vasculaire supérieur, intermédiaire, et profond. Ce réseau très dense permet de couvrir l'apport métabolique en oxygène et en nutriments nécessaire au fonctionnement de la rétine interne. Comme nous l'avons vu précédemment, la couche des photorécepteurs étant dépourvue de vaisseaux sanguins, la diffusion de métabolites est majoritairement organisée à partir des choriocapillaires.

La vasculature rétinienne suit une architecture classique : les branchements des artères donnent des artérioles qui alimentent un réseau de capillaires. Ce réseau est ensuite drainé par un ensemble de vénules qui se regroupent pour former les veines.

Ce réseau vasculaire forme la barrière hémato-rétinienne interne, et limite le passage aberrant des molécules circulant dans le sang du compartiment sanguin au compartiment tissulaire. Ce contrôle est permis par l'organisation sophistiquée de cette barrière, dont la composition sera détaillée au chapitre suivant « 1.2.3.1) Barrière hémato-rétinienne ».

1.2.3) Le privilège immun

L'œil est l'un des organes du corps humain auquel l'évolution a attribué une caractéristique assez singulière : le privilège immun. Ce mécanisme d'adaptation vise à protéger certaines structures vitales contre les dommages que pourrait entraîner une forte réaction inflammatoire : on conçoit aisément que la présence d'une cicatrice sur la rétine aurait un effet dommageable sur la perception visuelle. De plus, les neurones n'ont pas la capacité de se régénérer : c'est pourquoi le cerveau bénéficie lui aussi d'un tel privilège. Nous verrons ici comment s'organise le privilège immun autour de la rétine, en (i) empêchant l'intrusion de cellules immunitaires et (ii) favorisant leur élimination via des mécanismes immunosuppresseurs.

1.2.3.1) Barrière hémato-rétinienne

L'existence d'une barrière hémato-encéphalique (BHE) – notion introduite par Ehrlich et Goldman en 1909 - a fait débat pendant plusieurs dizaines d'années, jusqu'à ce que des recherches intensives conduisent à une résolution de ce débat et à une définition claire de ce qu'est la BHE (Bradbury, 1979). Le fonctionnement physiologique d'une barrière entre le sang et un tissu doit être perçu à travers l'interaction de plusieurs aspects restrictifs, permettant malgré tout la diffusion d'oxygène et de nutriments, comme le glucose (Ban and Rizzolo, 2000). Dans la rétine, il existe deux types de barrières hémato-rétiniennes (BHR) : une BHR interne formée par la paroi de vaisseaux présents dans la rétine interne, et une BHR externe constituée par les cellules épithéliales de l'épithélium pigmentaire. La BHR interne se trouve au niveau des plexus vasculaires de la rétine interne, et est formée par l'ensemble endothélium vasculaire/cellules gliales : au niveau du plexus supérieur, ce sont les astrocytes qui participent à la barrière, et au niveau du plexus profond, les cellules gliales de Müller (Rizzolo et al., 2011). La lame basale de l'endothélium et les péricytes participent eux aussi à la formation de cette barrière. Quant à la BHR externe, son organisation est sensiblement différente, puisqu'elle est constituée par la monocouche de cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), dérivée du neuro-épithélium embryonnaire (Rizzolo, 2007). L'efficacité de cette barrière est renforcée par la présence de jonctions serrées, riches en claudines et en occludines, permettant de joindre les cellules épithéliales de l'EPR (Konari et al., 1995; Nishiyama et al., 2002) : ainsi, les cellules circulantes ayant quitté les capillaires choroïdiens fenestrés n'ont théoriquement pas la possibilité de s'infiltrer jusque dans la rétine (Morcos et al., 2001). Cependant, l'intégrité des jonctions entre les cellules de l'EPR n'est pas à toute épreuve : l'épithélium pigmentaire est sensible au stress oxydant (Bailey et al., 2004), à la présence de macrophages péri-vasculaires (Boven et al., 2000), ou à l'action du TNF- α (Bamforth et al., 1996). Dans certaines conditions pathologiques, la BHR est ainsi déstabilisée, et ne permet plus d'empêcher correctement l'extravasation de monocytes circulants ou d'autres cellules inflammatoires (El Mathari et al., 2015; Narimatsu et al., 2013; Xu et al., 2005).

1.2.3.2) Immunosuppression

A la jonction entre la rétine neurale et la rétine pigmentaire, l'ensemble formé par la couche des photorécepteurs et l'épithélium pigmentaire en surplomb crée une zone dépourvue de vaisseaux sanguins : de plus, en condition physiologique, l'espace sous-rétinien, qui est la zone se trouvant entre les segments externes des photorécepteurs et l'EPR, est dépourvu de leucocytes (Figure 9 A). La membrane de Bruch, qui sépare l'EPR des chorio-capillaires qui sont en dessous, est composée de protéines matricielles qui ont un effet suppresseur sur la croissance des vaisseaux choroïdiens, et qui interviennent aussi dans l'effet immunosuppresseur de l'EPR.

Jusqu'au début des années 2000, on pensait que le privilège immun était maintenu uniquement par la séquestration d'antigènes (Streilein et al., 1992), l'absence de drainage lymphatique (Medawar, 1948), et la barrière hémato-rétinienne (Morcos et al., 2001). Mais il a été montré que l'EPR a un effet immunosuppresseur (Wenkel and Streilein, 2000) : c'est à dire qu'il exprime des facteurs solubles qui ont pour effet d'étouffer les réactions inflammatoires d'origine immunitaire, en protégeant ainsi les photorécepteurs d'une réaction inflammatoire exacerbée et maintenue sur le long terme, qui causerait des dommages au tissu.

Le système Fas-FasL induit par l'EPR est son outil le plus puissant pour favoriser le privilège immun, en induisant l'apoptose des cellules immunitaires (Griffith et al., 1995). Il est intéressant de noter que la surexpression de FasL (Fas ligand) dans une allogreffe ne suffit pas à reproduire les conditions du privilège immun (Kang et al., 1997), mais que l'inactivation génétique de FasL favorise l'accumulation sous-rétinienne de phagocytes mononucléés dans un modèle d'inflammation sous-rétinienne (Levy et al., 2015a). Cela suggère que la synergie de plusieurs facteurs est nécessaire pour éliminer correctement les macrophages qui entrent en contact avec l'EPR (Figure 9B).

L'EPR a en effet à sa disposition un autre système participant à l'élimination des phagocytes mononucléés : le système TSP-1/CD47. La Thrombospondine 1 (TSP-1) intervient dans de nombreux mécanismes biologiques, y compris l'immuno-modulation (Housset and Sennlaub, 2015) : elle est synthétisée par l'EPR (Miyajima-Uchida et al., 2000), et peut interagir avec le récepteur CD47 via sa séquence C-terminale (Lawler and Hynes, 1986). Or, l'activation du récepteur CD47 sensibilise les cellules à la mort induite par FasL (Manna et al., 2005). Dans un article récemment publié (Calippe et al., 2017), notre groupe a montré que la déficience en TSP-1 est effectivement associée à l'accumulation sous-rétinienne de phagocytes mononucléés, de même que la déficience en CD47, et l'utilisation de TSP-1 recombinante a permis d'accélérer l'élimination de ces macrophages. L'activation du récepteur CD47 rend donc les macrophages plus sensibles à l'apoptose induite par FasL (Figure 9B). Notons qu'il existe d'autres facteurs solubles immunosuppresseurs produits par l'EPR, comme le facteur de croissance TGF- β (Tanihara et al., 1993).

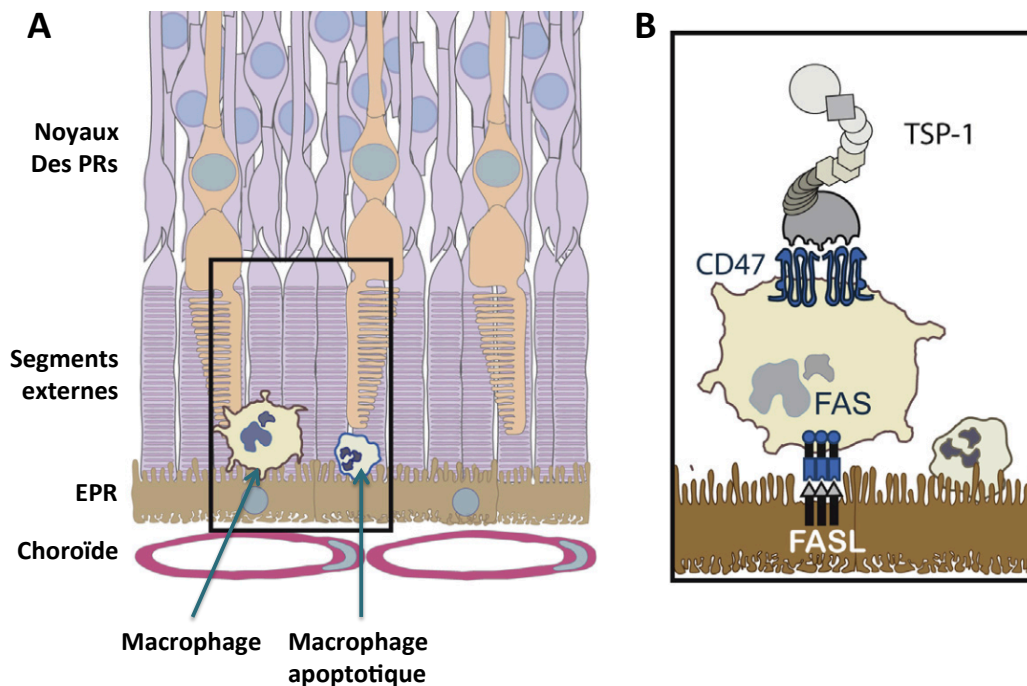


Figure 9 : Environnement immunosuppresseur de la rétine externe. Au niveau de l'espace sous-rétinien, l'activation du récepteur CD47 des macrophages par TSP-1 sensibilise les cellules inflammatoires à l'élimination induite par FasL. PRs : photorécepteurs. EPR : épithélium pigmentaire rétinien.

(Guillonnet al, 2017, Progress in Retinal & Eye Research)

1.3) Pathologies les plus fréquentes de la rétine

1.3.1) La rétinopathie diabétique

La rétinopathie diabétique (RD) est une complication courante du diabète, et est responsable d'une perte de vision sévère chez 30% des patients diabétiques (Wong et al., 2006). Sans traitement, la maladie progresse d'un stade modéré non-prolifératif à un état prolifératif sévère et avancé, caractérisé par la croissance de néo-vaisseaux rétiniens : quel que soit le stade concerné, la pathologie peut aussi être associée à la présence d'œdème rétinien. Au milieu des années 2000, l'introduction de l'administration intra-vitréenne d'anti-VEGF a permis une avancée spectaculaire dans le traitement de l'œdème maculaire associé à la RD. Les anti-VEGFs permettent la restauration de la vision chez une majorité de patients diabétiques (Varma et al., 2015). En France, la photocoagulation laser est aussi utilisée, afin de ralentir ou stopper la perte de vision (Bressler et al., 2011).

En terme de patho-mécanisme, l'accumulation de glutamate extracellulaire, ainsi qu'un défaut dans la production de facteurs neuroprotecteurs, semblent jouer un rôle primordial dans la neurodégénérescence rétinienne associée au diabète (Simó and Hernández, 2014). Le glutamate est un neurotransmetteur excitateur qui produit un

effet toxique sur les neurones lorsqu'il est en excès (Pulido et al., 2007). Le manque de facteurs neuroprotecteurs pourrait compromettre la protection neuronale contre ces mécanismes neurotoxiques. Ces caractéristiques font intervenir des dérégulations produites à l'échelle des cellules gliales (Mizutani et al., 1998; Omri et al., 2011), et pourraient contribuer à l'expression de médiateurs inflammatoires, favorisant l'aggravation de la pathologie.

1.3.2) La rétinite pigmentaire

Le terme « rétinite pigmentaire (RP) », ou *retinitis pigmentosa*, fait référence à un groupe de dystrophies rétiniennes héréditaires dégénératives, caractérisées par une perte progressive de la vision chez les patients, conduisant à la cécité. La RP a une prévalence de 1/3000 à 1/5000 (Bertelsen et al., 2014), avec un diagnostic difficile à établir précocement quand le patient n'a pas d'antécédents familiaux (Hamel, 2006).

Dans la plupart des cas, les patients RP présentent en premier lieu une perte des photorécepteurs en bâtonnets, qui entraîne une déficience de la vision nocturne – héméralopie - puis de la vision périphérique en journée. Cette dégénérescence est associée dans un deuxième temps à la mort des photorécepteurs en cônes, qui entraîne sur le long terme une perte totale de la vision.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement standard établi pour les patients RP, mais plusieurs voies thérapeutiques sont explorées, comme la thérapie cellulaire ou la thérapie génique. En cas de dégénérescence trop avancée, le système de prothèse rétinienne, ou Argus II, permet de contourner les photorécepteurs endommagés via l'implantation d'une rétine artificielle (Berger et al., 2016). Les médecins préconisent essentiellement des méthodes visant au retardement de l'évolution de la maladie : on conseille aux patients de réduire leur exposition à la lumière, et de suivre un régime supplémenté en vitamine A (Berson, 1993), bien que le bénéfice de ces approches soit encore débattu (Rayapudi et al., 2013).

1.3.3) DMLA

La dégénérescence maculaire liée à l'âge, ou DMLA, est la première cause de cécité chez les seniors dans les pays développés. Elle est associée à une combinaison de plusieurs facteurs génétiques et environnementaux. La DMLA présente deux formes tardives : une forme humide, et une forme sèche pour laquelle il n'existe actuellement aucun traitement. Dans les deux cas, la DMLA entraîne une perte gravissime de la vision en endommageant la rétine centrale de manière irrémédiable.

Les caractéristiques de la DMLA seront exhaustivement traitées au chapitre suivant « II) DMLA et inflammation ».

II) DMLA & inflammation

2.1) Physiopathologie de la DMLA

La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age est une pathologie dégénérative de la rétine et qui affecte la fovéa, zone centrale de la rétine riche en cônes et responsable de l'acuité visuelle. C'est la première cause de déficience visuelle au monde : elle affecte plus de 150 millions d'individus (Wong et al., 2014).

2.1.1) La maculopathie liée à l'âge

Le premier stade de la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA) est un stade asymptomatique dit maculopathie liée à l'âge. A l'examen du fond d'œil, on peut observer des dépôts lipoprotéiques appelés drusens (Figure 10 B), localisés entre la membrane de Bruch et l'épithélium pigmentaire (EPR), et dont la distribution et la taille varient d'un patient à l'autre ; on observe aussi une pigmentation irrégulière de l'EPR (Bird et al., 1995).

Les drusens, présents au stade maculopathie, peuvent prendre la forme de dépôts linéaires ou de protrusions plus larges – supérieures à 125 um - appelées drusens « soft » (Curcio and Millican, 1999; Sarks, 1976). Ces protrusions déforment la rétine, ce qui conduit à l'apparition des métamorphopsies (Biarnés et al., 2011) (Figure 10 H), et sont associées à une diminution de l'épaisseur de la couche des photorécepteurs (Schuman et al., 2009), ainsi qu'à une perte de sensibilité (Midena et al., 2007; Puell et al., 2012). Les drusens dits « hard », de plus petite taille – inférieure à 63 um - ne sont généralement pas associés au développement de la maladie, sauf si ils sont présents en grand nombre au niveau de la macula (Klein et al., 2004).

2.1.2) Les formes tardives de la DMLA

On ne connaît pas encore toutes les raisons qui expliquent pourquoi les patients souffrant de maculopathie liée à l'âge développent les formes tardives de la DMLA, mais il semblerait que cette évolution soit liée à une combinaison entre certains facteurs de risques environnementaux, et une prédisposition génétique (Yu et al., 2012). Il existe deux formes cliniques de DMLA tardive : la DMLA exsudative ou humide, et la DMLA atrophique ou sèche (Sarks, 1976).

2.1.2.1) Forme sèche

L'atrophie géographique est l'une des formes tardives de la DMLA : elle est caractérisée par la perte irréversible des photorécepteurs, et la dégénérescence de l'épithélium

pigmentaire rétinien (EPR) (Holz et al., 2014; Sarks et al., 1988). L'atrophie géographique affecte approximativement 5 millions de personnes à travers le monde, et sa prévalence augmente exponentiellement avec l'âge (Rudnicka et al., 2015; Wong et al., 2014). La lésion atrophique se développe d'abord au niveau de la périfovée (Sarks et al., 1988), puis s'étend progressivement jusqu'à atteindre la fovée elle-même (Figure 10 E) : l'atrophie est typiquement bilatérale (Lindblad et al., 2009). L'atrophie de la zone périfovéale affecte la performance visuelle, ce qui a un impact considérable sur les capacités liées à la lecture, la conduite, et la perception visuelle en conditions scotopiques (Brown et al., 2014; Sunness et al., 1997). Lorsque la lésion atteint la fovée, l'acuité visuelle centrale est profondément affectée (Lindblad et al., 2009) (Figure 10 G, I), et la nature et la vitesse de progression de la lésion varient significativement selon les patients.

2.1.2.2) Forme humide

La deuxième forme tardive de la DMLA est appelée forme humide, ou stade néo-vasculaire, et progresse rapidement. La DMLA humide est caractérisée par la formation de néo-vaisseaux qui se développent à partir de la choroïde dans 85% des cas, et conduisent à l'accumulation intra-rétinienne ou sous-rétinienne de fluides (Figure 10 F), sang et lipides (Rosenfeld et al., 2006) jusqu'à former des exsudats vasculaires ou un œdème maculaire, voire un décollement de rétine. L'accumulation de fluides s'accompagne de la croissance d'une membrane fibreuse néo-vasculaire, qui sur le long terme entraîne la perte irréversible de la vision associée la formation d'une cicatrice disciforme sous-rétinienne (Sarks, 1976). La croissance des néo-vaisseaux dépend de la production de VEGF (Rosenfeld et al., 2006), produit par les cellules de l'EPR, ou par les macrophages qui s'accumulent dans l'espace sous-rétinien (Ishibashi et al., 1997). On recense deux types de néo-vaisseaux choroïdiens : les néo-vaisseaux occultes, qui se développent sous l'EPR, et les néo-vaisseaux classiques, qui traversent l'EPR et envahissent la couche des photorécepteurs, et sont donc visibles en fond d'œil.

2.2) Caractéristiques de la DMLA

2.2.1) Statistiques épidémiologiques

Les premiers symptômes cliniques de la DMLA peuvent apparaître dès 50 ans, et augmentent ensuite progressivement avec l'âge jusqu'à la perte totale de vision.

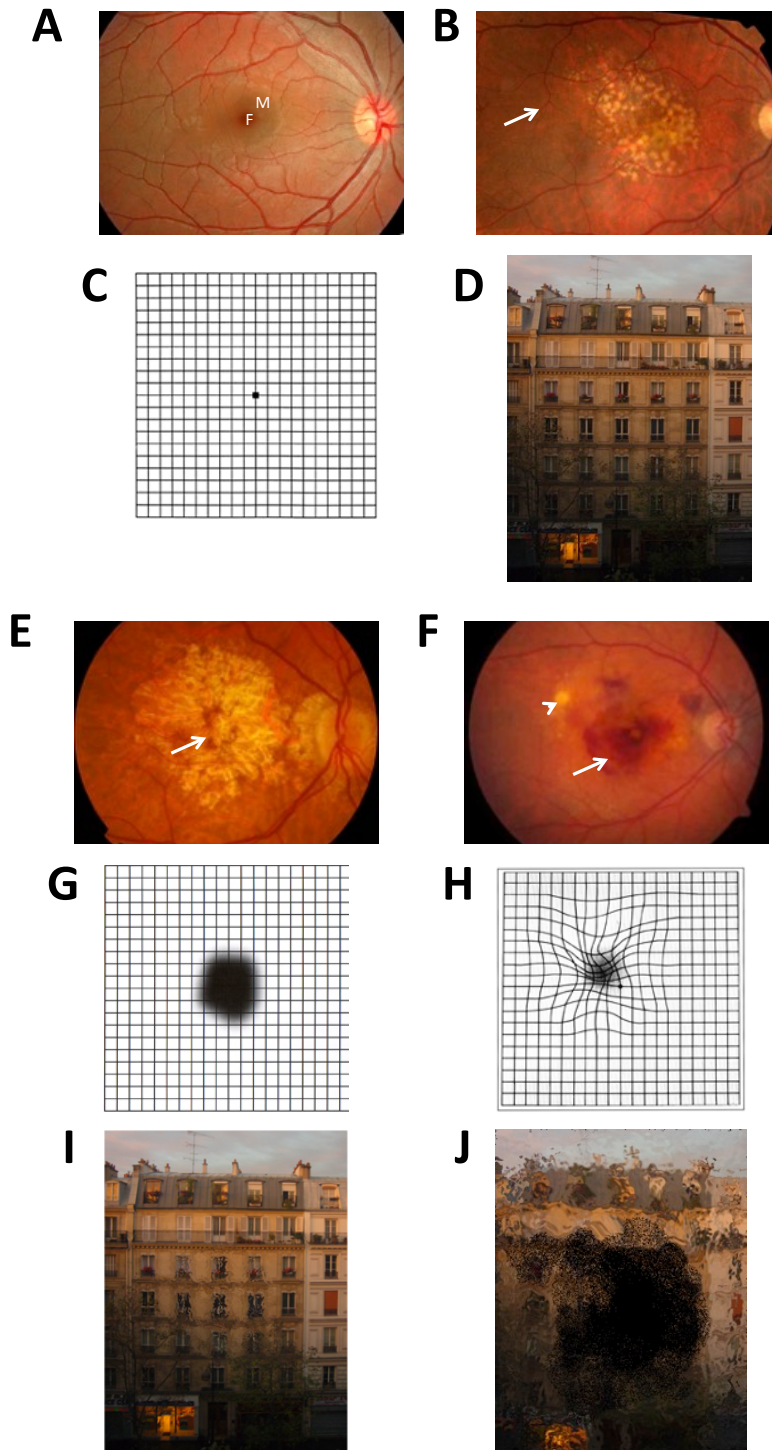


Figure 10 : La DMLA, une pathologie évolutive. Fonds d'œil d'un patient sain (A), présentant une maculopathie (B), une atrophie géographique (E), ou une DMLA humide (F). Le test de la grille d'Amsler permet de détecter les métamorphopsies (H), ou les zones de perte de vision (G), absentes chez le patient sain (C). Les photos représentent l'impact sur la vision de patients atrophiques (I) ou présentant une DMLA néo-vasculaire (J) par rapport à un patient sain (D). F : fovéa. M : macula.

La population atteinte par la DMLA est de 2% pour les moins de 60 ans, et de 30% pour les séniors de plus de 75% (Bernstein, 2009). Aux Etats-Unis, la maculopathie liée à l'âge concerne entre 5 et 7% des séniors de moins de 55 ans : mais pour les individus de plus de 75 ans, la prévalence augmente jusqu'à 25% (Friedman et al., 2004). Concernant les formes tardives de la DMLA, la prévalence atteint 8% chez les personnes de plus de 75 ans (Friedman et al., 2004). Les patients atteints de maculopathie asymptomatique et qui présentent des drusens soft larges ont 15 à 30% de chances de développer une forme tardive de la DMLA (Klein et al., 2004; Wang et al., 2003) avec 55% de risque de basculer vers la forme exsudative, et 45% vers la forme atrophique (Klein et al., 2002). La DMLA est donc enjeu de santé publique majeure, d'autant que la population des pays industrialisés est de plus en plus vieillissante. En 2004 aux Etats-Unis, 1,75 millions de personnes présentaient l'un des stades avancés de la DMLA, et 7,3 millions étaient au stade intermédiaire, avec donc une probabilité accrue de développer les formes tardives (National Eye Institute. Prevalence of Eye Disease Table. 2004). Malheureusement, il n'existe pas encore de traitements pour la forme sèche, et les traitements anti-VEGF utilisés dans la forme humide sont incapables de ralentir les conséquences neuro-dégénératives et la perte de la fonction visuelle associés à la croissance de vaisseaux chez 10% des patients (Rofagha et al., 2013).

2.2.2) Caractéristiques et symptômes

L'examen du fond d'œil est le moyen le plus rapide et le plus efficace d'observer la rétine d'un patient : il est réalisé sans douleur, et sans anesthésie. Chez les patients atteints de pathologies rétinienne, le fond d'œil permet le suivi du patient, et l'établissement d'un diagnostic, puisqu'il révèle la présence de néo-vaisseaux papillaires non-occultes, de fuites vasculaires, de drusens, ou d'un décollement de rétine.

La tomographie à cohérence optique, ou « optical coherence tomography » (OCT) est un examen non-invasif qui utilise la projection d'ondes lumineuses pour examiner la structure de la rétine : L'OCT permet au médecin d'analyser la structure et l'épaisseur des couches rétinienne.

Enfin, l'angiographie rétinienne permet d'apprécier au fond d'œil l'état de la vascularisation grâce à l'injection d'un composé fluorescent – la fluorescéine – dans la circulation sanguine.

Le praticien peut observer les lésions de l'atrophie géographique à l'aide de ces différentes techniques, et ainsi en identifier les particularités anatomiques, comme la visibilité accrue des vaisseaux choroïdiens observables au fond d'œil, l'absence de lipofuscine autofluorescente de l'EPR, ou l'hypertransmission lumineuse à travers les couches rétinienne observable en OCT. Au fond d'œil, les lésions atrophiques sont nettement visibles et se démarquent par l'aspect hypo-pigmenté de l'EPR, qui laisse transparaître les vaisseaux choroïdiens. En OCT, les lésions atrophiques sont généralement identifiées grâce à la perte des couches externes de la rétine –

correspondant à la dégénérescence de l'EPR et des photorécepteurs. Le phénomène d'hypertransmission choroïdienne causé par la disparition des structures absorbantes de la rétine externe peut permettre chez certains patients de délimiter plus précisément les bordures des zones atrophiques (Fleckenstein et al., 2010). L'examen à la fluorescéine permet aussi d'identifier les lésions atrophiques, qui sont définies dans les premières minutes du test par des zones hyperfluorescentes. Cette caractéristique est due à l'absence de l'EPR, qui permet de visualiser nettement le colorant fluorescent qui circule dans les vaisseaux choroïdiens. Le colorant finit ensuite par diffuser plus largement, rendant la détection précise des limites de la zone atrophiques plus compliquée.

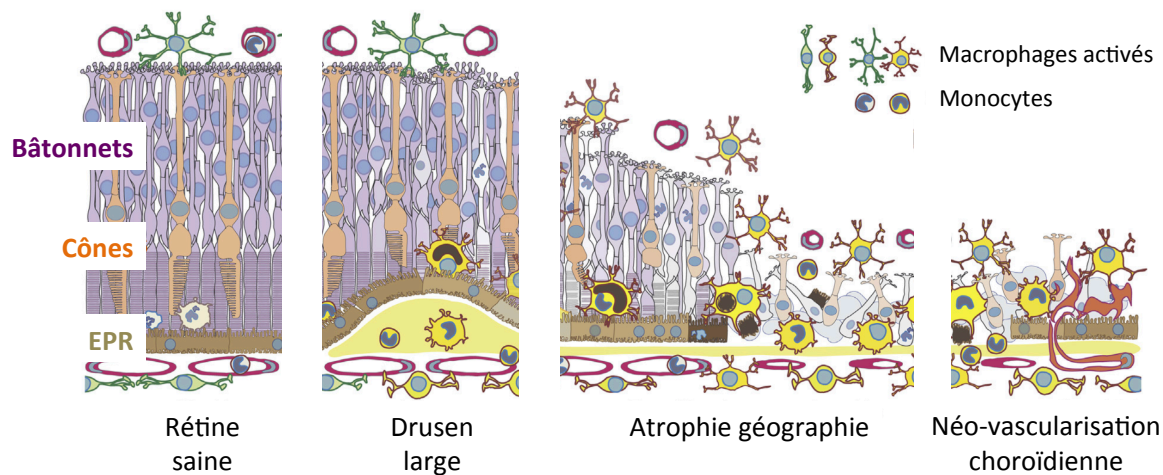


Figure 11 : Accumulation de phagocytes mononucléés dans la DMLA. Chez les patients sains, l'espace sous-rétinien est dépourvu de phagocytes mononucléés. Ceux-ci s'accumulent du côté apical de l'épithélium pigmentaire (EPR) autour des drusens larges, au niveau de la zone atrophique et de la zone de transition dans l'atrophie géographique, et à proximité des lésions vasculaires dans la DMLA humide, où ils phagocytent les débris et les pigments de l'EPR dégénèrescent.

(Guillonnet et al, 2017, Progress in Retinal & Eye Research)

2.2.3) Les facteurs de risque

De nombreux facteurs de risque associés au développement de la DMLA ont été identifiés, en lien avec certains polymorphismes génétiques, l'origine ethnique, les habitudes alimentaires – carence en vitamines ou régime riche en graisses –, la condition physique – rythme de vie sédentaire, consommation de tabac, facteurs de risque cardiovasculaires – ou même en lien avec l'environnement, comme l'exposition prolongée à de fortes intensités lumineuses (Chakravarthy et al., 2010). Une partie de ces facteurs de risque est avérée, et les mécanismes qui les sous-tendent ont pu être en partie éclaircis, alors que d'autres présentent un lien mécanistique avec la DMLA qui reste encore obscur. Mais dans l'ensemble, de plus en plus d'indices révèlent la

contribution de ces facteurs de risque à une toxicité induite par les membres de la famille des phagocytes mononucléés (Figure 11).

2.2.3.1) Les facteurs de risque avérés en lien avec l'inflammation

Age : De toute évidence, le premier facteur de risque lié à la DMLA est l'âge. Le vieillissement impacte la régulation homéostatique à plusieurs niveaux via des mécanismes qui n'ont pas tous été explicités. Chez la souris, le vieillissement suffit à induire l'accumulation sous-rétinienne de phagocytes mononucléés (Damani et al., 2011), et cet effet est amplifié dans les modèles murins où la résolution de l'inflammation et l'élimination des macrophages sont inactivées (Calippe et al., 2017; Combadière et al., 2007; Levy et al., 2015a; Sennlaub et al., 2013).

En effet, le vieillissement est associé avec l'accroissement de la production de chimiokines dans l'œil comme le CCL2, favorisant le recrutement de monocytes circulants (Sennlaub et al., 2013), et avec la perte des propriétés immunosuppressives de l'espace sous-rétinien, prévenant la résolution de l'inflammation (Damani et al., 2011). De plus, les monocytes circulants des sujets âgés présentent une production accrue de cytokines (Hearps et al., 2012). Enfin, des expériences de transplantation de moelle osseuse de souris âgées dans des souris plus jeunes ont montré que la forte néo-vascularisation induite par impact laser dépendait des cellules dérivées de la moelle (Zhao et al., 2013).

Ces résultats montrent l'impact majeur qu'a le vieillissement du système immunitaire dans la pathogénèse de la DMLA (Figure 11).

Prédisposition génétique : La DMLA est une pathologie héréditaire : le seul fait d'avoir un parent atteint augmente le risque de développer la DMLA d'un facteur 5 à 10 (Chakravarthy et al., 2010). L'étude la plus récente montre que 52 variants génétiques indépendants et répartis sur 34 loci sont associés à la DMLA (Figure 12 A) : 16 de ces loci incluent des gènes majoritairement associés au métabolisme lipidique ou à l'inflammation (Fritsche et al., 2015). Plusieurs autres études ont montré que le risque génétique associé à la DMLA est dû à certaines isoformes d'ApoE (Fritsche et al., 2015; Swaroop et al., 2007) et de CFH (Fritsche et al., 2013, 2014; Magnusson et al., 2006) ainsi qu'à l'allèle à risque 10q26 (Swaroop et al., 2007; Yang et al., 2006). Ces gènes étant tous exprimés par les macrophages (Figure 12B), leurs différents variants impactent leurs fonctions et favorisent la promotion de l'inflammation, très certainement indépendamment de la dégénérescence de l'EPR, de la choroïde ou des photorécepteurs.

Les mécanismes inflammatoires induits par l'expression de ces facteurs de risque par les macrophages, et la manière dont ils favorisent le déséquilibre d'une réaction inflammatoire initialement bénéfique seront détaillés au chapitre « 2.3.2) Rôle des facteurs de risque génétique ».

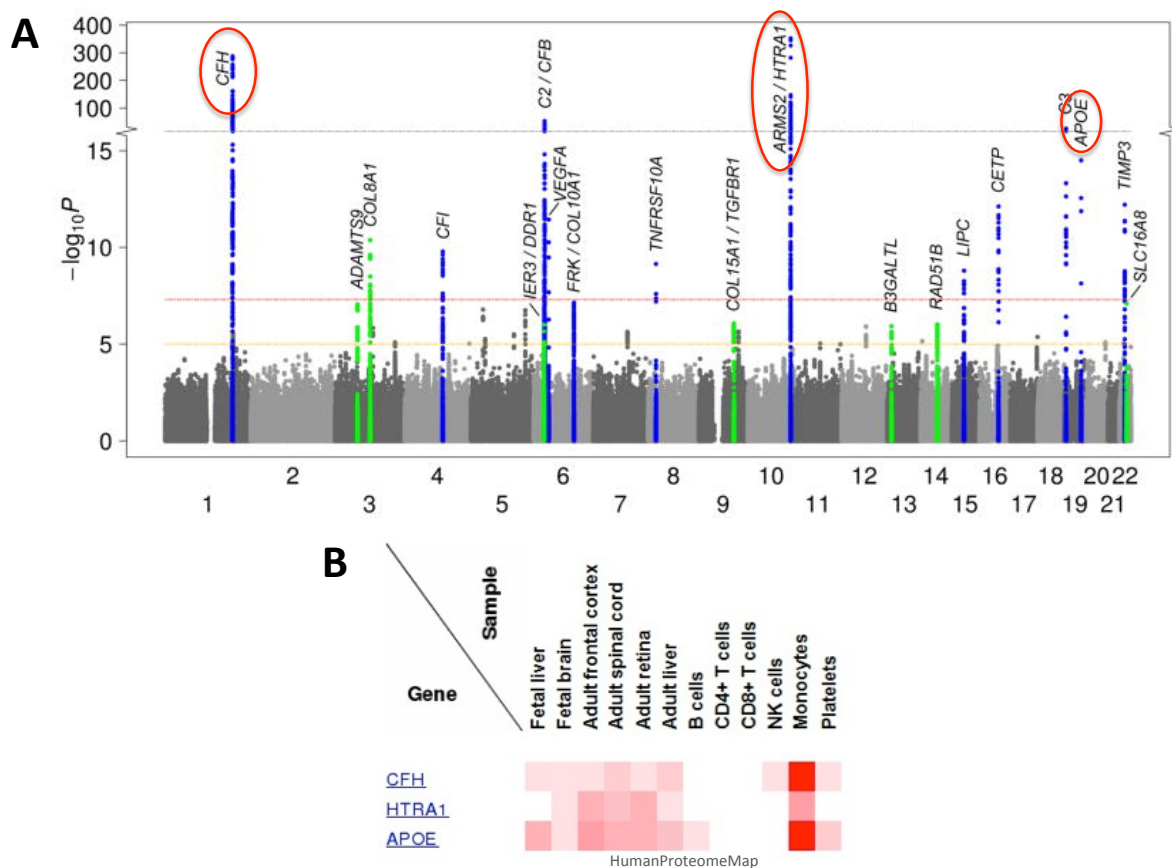


Figure 12 : Les variants génétiques associés à la DMLA influencent l'inflammation. Les variants génétiques des gènes APOE, CFH et HTRA1 sont fortement associés à la DMLA (A). APOE, CFH et HTRA1 sont fortement exprimés par les phagocytes mononucléés (B).

(D'après Fritsche et al, 2015, Nature Genetics)

2.2.3.2.) Les facteurs de risque environnementaux

Cigarette : Les fumeurs ont entre 2,6 et 4,8 fois plus de probabilité de développer l'une des formes tardives de la DMLA, et les anciens fumeurs sont eux aussi exposés à un risque accru, avec une probabilité 1,7 fois supérieure (Chakravarthy et al., 2007). Les mécanismes qui lient la consommation de cigarette à la DMLA ont malheureusement été assez peu explorés jusqu'à ce jour.

Exposition à la lumière : L'exposition prolongée à une forte intensité lumineuse a aussi été associée chez les patients à un accroissement du risque de développer la forme précoce et la forme tardive de la DMLA (Fletcher et al., 2008; Schick et al., 2016). Mais les mécanismes qui lient ces deux évènements n'ont pas été clairement élucidés.

Obésité : Les résultats de plusieurs études menées sur d'importantes cohortes de patients suggèrent que l'obésité est un important facteur de risque pour la DMLA.

L'étude de la Melbourne Collaborative Cohort a montré que l'obésité abdominale chez les hommes accroît de 13% le risque de développer une DMLA précoce, et de 75% pour la DMLA tardive (Adams et al., 2011). De même, une autre étude a montré que la réduction du ratio taille/hanches – qui permet d'évaluer l'obésité abdominale – chez les individus d'âge moyen était associée à une diminution de 3% du risque de développer la DMLA, particulièrement chez les personnes en surpoids (Peeters et al., 2008).

2.2.4) Traitements

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement pour l'atrophie géographique, ni pour ralentir, ni pour inverser sa progression. Une étude clinique de phase 3 conduite par Roche et dont les premiers résultats sont attendus pour septembre 2018 a pour but d'évaluer l'effet d'un nouveau médicament, le Lampalizumab. Ce traitement, administré par injection intra-vitréenne est censé ralentir la progression de la lésion atrophique, en inhibant la voie alternative du complément via le facteur D. Ce traitement présente des effets prometteurs (Yaspan et al., 2017), même si une précédente étude clinique conduite par Genentech n'a pas donné les effets escomptés. D'autres pistes thérapeutiques sont actuellement explorées, comme la transplantation de cellules souches, l'utilisation d'implants rétinien, ou l'inhibition du facteur 3 du complément.

Concernant la DMLA exsudative, les perspectives thérapeutiques sont moins sombres puisqu'il existe au moins deux traitements : (i) la thérapie photo-dynamique, aujourd'hui délaissée au profit de (ii) la thérapie anti-VEGF. La thérapie photo-dynamique (PDT) avait été établie comme une alternative sûre et efficace pour traiter la DMLA humide (Bressler and Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy (TAP) Study Group, 2001). Il s'agit d'une photothérapie par laser, qui consiste à générer des radicaux libres dans le tissu sous-rétinien. Ces radicaux libres ont un effet cytotoxique sur les vaisseaux néo-formés, et permettent la régression de la néo-vascularisation après injection intraveineuse d'un agent photosensible, la vertéporfine. Cette thérapie avait été abandonnée après la découverte de l'efficacité des thérapies anti-VEGF, mais certaines études ont montré un effet positif des deux thérapies combinées (Koh et al., 2012).

A l'heure actuelle, ce sont les traitements anti-VEGF qui sont les plus utilisés. Le ranibizumab est un fragment d'anticorps monoclonal qui inhibe le VEGF et prévient la néo-vascularisation choroïdienne. Il est autorisé par la FDA dans le traitement de la DMLA exsudative (Agarwal et al., 2015). L'aflibercept est une protéine recombinante de fusion, composée d'une portion des récepteurs 1 et 2 au VEGF (VEGFR-1 et VEGFR-2) fusionnées au niveau du domaine Fc de l'immunoglobuline humaine G1. Ce composé présente une plus haute affinité que le ranibizumab pour piéger le VEGF et former un complexe inerte stable (James A Dixon, Scott CN Oliver, Jeffrey L Olson, 2009). Ce médicament présente un avantage certain de part son efficacité, et sa demi-vie plus longue permettant de réduire le rythme des injections. Enfin, le bevacizumab est un

anticorps monoclonal humain recombinant, qui se lie au VEGF et l'inhibe (Baka et al., 2006). Il se différencie du ranibizumab par la présence du domaine Fc, mais est moins cher, ce qui en fait un traitement alternatif permettant de réduire le coût de la prise en charge de la DMLA néo-vasculaire (Haller, 2013).

2.3) Inflammation dans la DMLA

2.3.1) Le système des phagocytes mononucléés

2.3.1.1) Progéniteurs, monocytes et macrophages

2.3.1.1.1) Origine des monocytes

Le système des phagocytes mononucléés est décrit comme un sous-groupe des leucocytes : c'est une population de cellules myéloïdes dérivées de progéniteurs localisés dans la moelle. Nous décrivons ici ce système en rapport avec le système nerveux central. Dans le SNC, le système des phagocytes mononucléés comprend les monocytes (Mos), les macrophages inflammatoires dérivés des monocytes (iMF), les cellules dendritiques (CDs), et les macrophages résidents (rMF) incluant les microglies (MCs).

De manière générale, les monocytes circulant dans le sang sont recrutés au niveau des tissus où ils se différencient en macrophages, en conditions basales comme dans le cadre d'une inflammation locale (van Furth, 1976). On observe cependant de grandes disparités relatives à l'origine des macrophages résidents selon les tissus : le SNC par exemple est intégralement colonisé au cours du développement par des progéniteurs provenant du sac vitellin, donnant la population de microglies qui persiste jusqu'à l'âge adulte (Ginhoux et al., 2010b). D'autres tissus comme les poumons sont colonisés par les macrophages dérivés de progéniteurs embryonnaires provenant de la moelle ou du sac vitellin (Guilliams et al., 2013). Enfin, certains organes comme le cœur sont colonisés au cours du développement, et leur population en macrophages est progressivement renouvelée au cours de la vie par l'invasion de macrophages CCR2+ dérivés de la moelle, ainsi que par auto-renouvellement (Epelman et al., 2014). Selon leur origine, les macrophages présentent une grande hétérogénéité de phénotypes et de fonctions, notamment dans la manière dont ils répondent à une blessure ou un stress inflammatoire. C'est pourquoi il est important de différencier dans le SNC les macrophages résidents des macrophages inflammatoires recrutés à partir des monocytes circulants dans le cadre de l'inflammation.

Les cellules de la lignée myéloïde proviennent d'un progéniteur commun : la cellule souche hématopoïétique (HSC) (Figure 13). Les HSCs se différencient en progéniteurs

myéloïdes communs (CMPs), qui donnent à leur tour les précurseurs aux granulocytes et macrophages, ou myéloblastes (GMPs). Ceux-ci se différencient enfin en progéniteur commun aux cellules dendritiques et aux monocytes (MDPs), qui donnent naissance aux monocytes et aux cellules dendritiques (Geissmann et al., 2010). Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes qui régulent l'immunité adaptative en modulant la réponse de lymphocytes T. Elles ne sont pas présentes en nombre représentatif dans la rétine : leurs caractéristiques ne seront donc pas décrites plus en détail ici, et nous nous focaliserons sur les monocytes circulants.

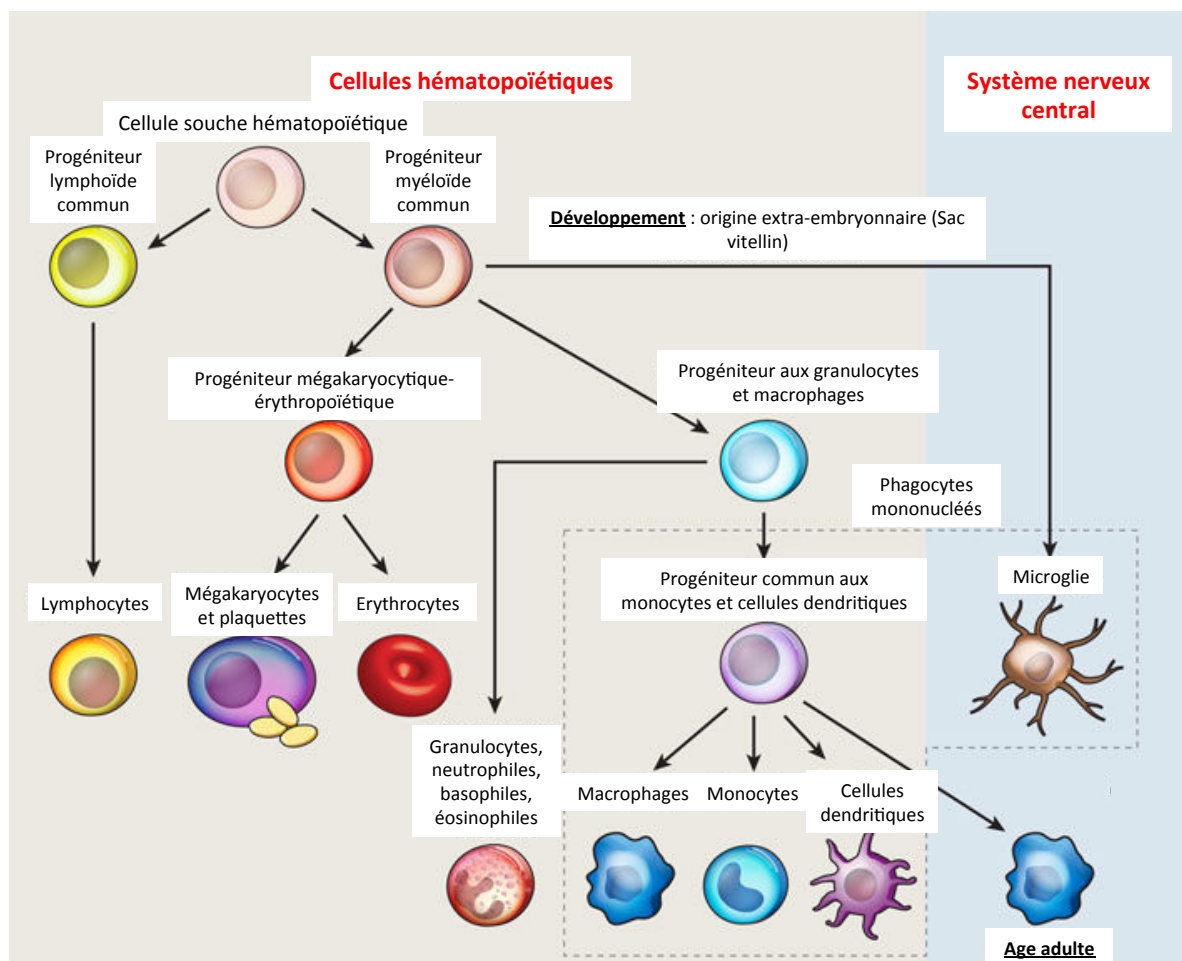


Figure 13 : Origine et différenciation des monocytes. Les monocytes et les macrophages sont issus de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques au cours du développement et à l'âge adulte. Les microglies - macrophages résidents du système nerveux central - proviennent de la différenciation de précurseurs présents dans le sac vitellin au cours du développement.

(D'après Ransohoff, 2010, Nature Reviews)

2.3.1.1.2) Les monocytes

Les monocytes circulants expriment un large panel de récepteurs aux chimiokines et aux motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) qui conditionnent leur recrutement (Serbina et al., 2008). Les monocytes sont capables de produire une grande quantité de molécules pro-inflammatoires, et peuvent se différencier en CD4 ou en macrophages lorsqu'ils sont recrutés au sein d'un tissu durant l'inflammation (Randolph et al., 1999).

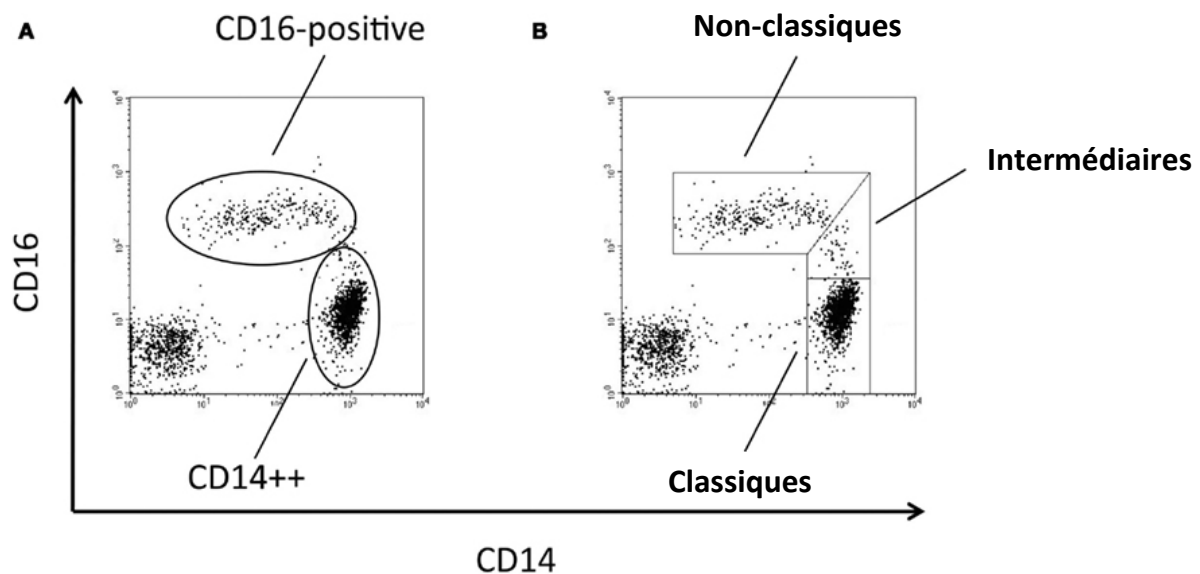


Figure 14 : Les marqueurs CD14 et CD16 permettent d'identifier les sous-populations de monocytes.

(D'après Ziegler-Heitbrock et al, 2013, Frontiers in Immunology)

Chez l'homme, il existe trois populations de monocytes circulants (Figure 14), définies par l'expression différentielle des marqueurs de surface CD14 et CD16 (Ziegler-Heitbrock et al., 2010) : (i) Les monocytes classiques expriment fortement CD14 mais pas CD16 (CD14++CD16-), (ii) les monocytes non-classiques expriment fortement CD16 et faiblement CD14 (CD14+CD16++), et (iii) les monocytes intermédiaires expriment de hauts niveaux de CD14 et de faibles niveaux de CD16 (CD14++CD16+). On retrouve une classification similaire chez la souris, avec des monocytes classiques Ly6C^{high}CCR2^{high}CX3CR1^{low}, alors que les monocytes non-classiques ont un profil Ly6C^{low}CCR2^{low}CX3CR1^{high} (Geissmann et al., 2010; Si et al., 2010). Ces profils d'expression de CCR2 et CX3CR1 sont identiques chez l'homme, mais ne sont pas utilisés pour identifier les sous populations de monocytes car ils ne permettent pas de caractériser la population de monocytes intermédiaires.

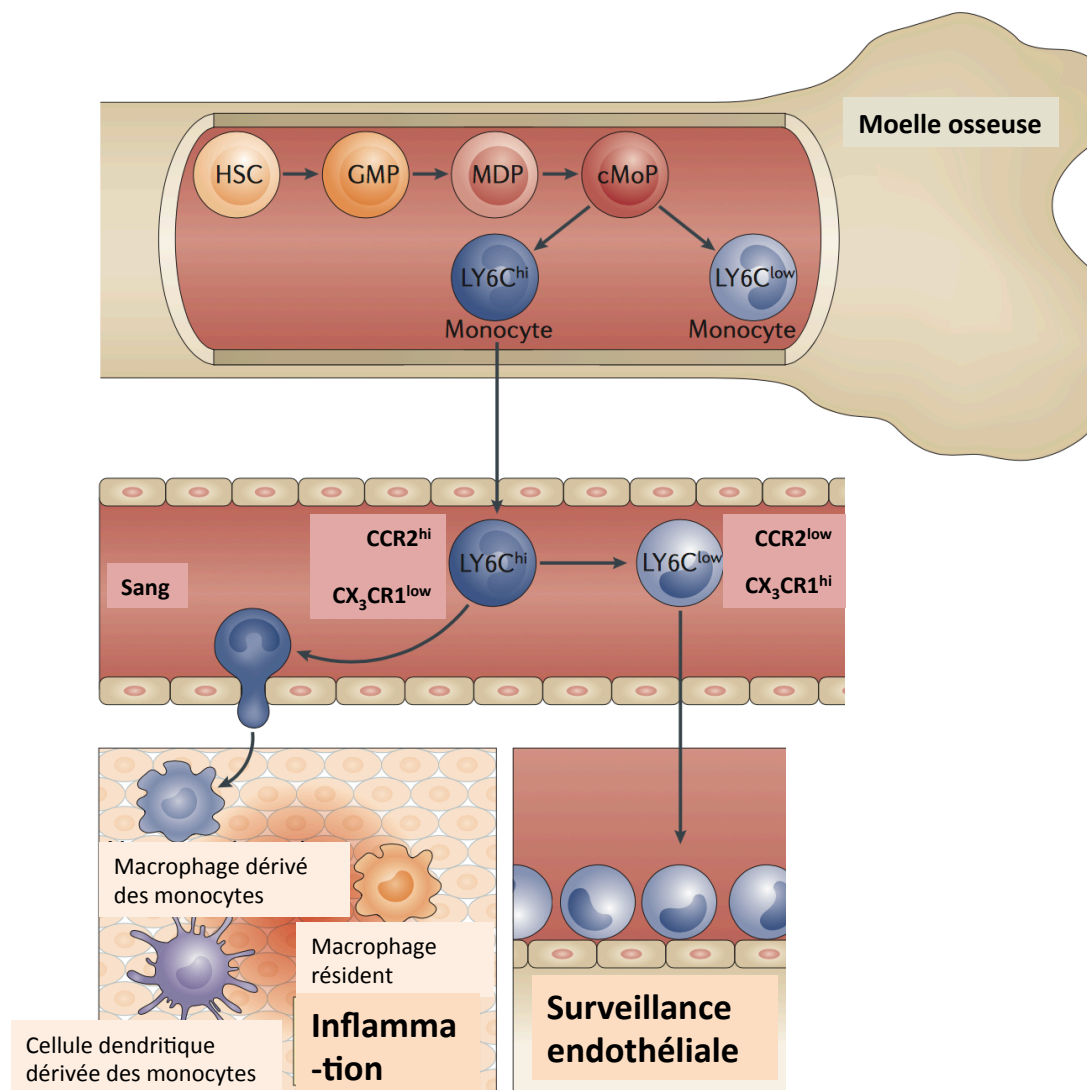


Figure 15 : Origine des macrophages chez la souris. Les monocytes sont continuellement générés à partir des cellules souches de la moelle osseuse. Les monocytes classiques sont recrutés au niveau des tissus en cas d'inflammation, où ils se différencient en macrophages inflammatoires. Les monocytes non-classiques patrouillent le long de l'endothélium vasculaire, et favorisent le recrutement des neutrophiles.

(D'après Ginhoux et al, 2014, Nature Review Immunology)

Les monocytes classiques ou inflammatoires répondent fortement à l'activation du Toll-like receptor 4 (TLR4) induite via le LPS, en produisant des cytokines inflammatoires : IL-6, IL-8, CCL2 (Chow et al., 1999). Ils interviennent dans la première ligne de défense contre les pathogènes (Figure 15), et jouent un rôle essentiel dans de nombreuses pathologies inflammatoires (Chuluundorj et al., 2014; Reed-Geaghan et al., 2010). Les monocytes non-classiques ont un rôle de « patrouilleur » : ils évoluent le long des vaisseaux sanguins, et activent des mécanismes dépendants de CX₃CR1 et de l'intégrine LFA-1, permettant une invasion rapide du tissu par les monocytes classiques en cas de dommage ou d'infection (Auffray et al., 2007). Enfin, les monocytes intermédiaires qui sont particulièrement difficiles à identifier demeurent relativement peu étudiés, mais

semblent jouer un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire (Figure 15) dirigée contre les parasites (Turner et al., 2014) ou impliquée dans l'asthme (Moniuszko et al., 2009).

2.3.1.1.3) Les macrophages

Les macrophages résidents – par opposition aux macrophages inflammatoires recrutés à partir du pool de monocytes circulants – jouent un rôle de sentinelle et fournissent un soutien trophique : ils sont présents dans presque tous les tissus, qu'ils colonisent le plus souvent au cours du développement, en se différenciant à partir des monocytes du sac vitellin ou provenant du foie (Gautier and Yvan-Charvet, 2014). Dans la rétine les macrophages résidents sont les microglies, qui interviennent au cours de la formation des synapses, éliminent les neurones apoptotiques ... : les caractéristiques des microglies sont détaillées dans le paragraphe « 1.2.2.2.3.2) Les microglies résidentes ».

Il faut différencier les macrophages résidents des macrophages recrutés lors d'une réaction inflammatoire, et qui sont théoriquement présents de manière transitoire, et éliminés lors de la résolution de l'inflammation. Ces macrophages dérivent de la population de monocytes CCR2+ (Figure 15), et se différencient en rejoignant le site de l'inflammation (Geissmann et al., 2003). Ces macrophages présentent une taille plus importante que les monocytes, et interviennent dans l'inflammation, la phagocytose, le remodelage tissulaire et la cicatrisation : ils possèdent donc une machinerie cellulaire très développée et sont très plastiques (Mantovani et al., 2005).

2.3.1.2) Accumulation chronique des macrophages dans la DMLA

2.3.1.2.1) Les origines de l'inflammation chronique

Les phagocytes mononucléés sont les médiateurs d'une inflammation de bas-grade, théoriquement censée maintenir les fonctions tissulaires. Ils interviennent pour éliminer les pathogènes, ou détruire par phagocytose les débris toxiques extracellulaires. Par exemple, le recrutement de monocytes inflammatoires peut être bénéfique vis-à-vis de la survie des photorécepteurs dans certains cas extrêmes, comme l'élimination de doses toxiques de β -amyloïde exogène (Bruban et al., 2011). Dans la plupart des cas, l'inflammation finit par se résoudre : mais si elle n'est pas rapidement contrôlée, ou si la situation homéostatique ne retourne pas à un équilibre physiologique, elle peut persister sur un plus long terme. Cet état, défini comme une « para-inflammation » (Medzhitov, 2008) pourrait intervenir dans les phases les plus précoces de la DMLA, où les macrophages s'accumulent autour des drusens pour participer à l'élimination des débris. La concordance de plusieurs facteurs de risque, comme par exemple une baisse de l'efficacité homéostatique associée à un polymorphisme

défavorisant la résolution de l'inflammation, pourrait alors susciter l'installation d'une inflammation chronique, avec des conséquences neuro-toxiques.

2.3.1.2.2) Le recrutement des macrophages

A l'état basal, on ne trouve aucun phagocyte mononucléé (PMs) dans la couche des photorécepteurs ou l'espace sous-rétinien, mais ceux-ci s'accumulent avec l'âge chez les patients atteints de DMLA. Il est très difficile de distinguer les différentes sous-populations de PMs, compte-tenu du fait qu'ils expriment des marqueurs similaires, mais on peut différencier les microglies CCR2- (Mizutani et al., 2012) des macrophages inflammatoires CCR2+ (Saederup et al., 2010).

CCL2 est le ligand du récepteur CCR2 : son expression est induite par les microglies en réponse à un signal de danger, mais CCL2 est aussi produite par les macrophages inflammatoires (Sennlaub et al., 2013), les cellules gliales de Müller (Rutar et al., 2012) et l'EPR (Chen et al., 2008). L'expression de CCL2 dans la rétine augmente avec l'âge (Nakazawa et al., 2007) ainsi que chez les patients atteints de DMLA néo-vasculaire et atrophique (Newman et al., 2012).

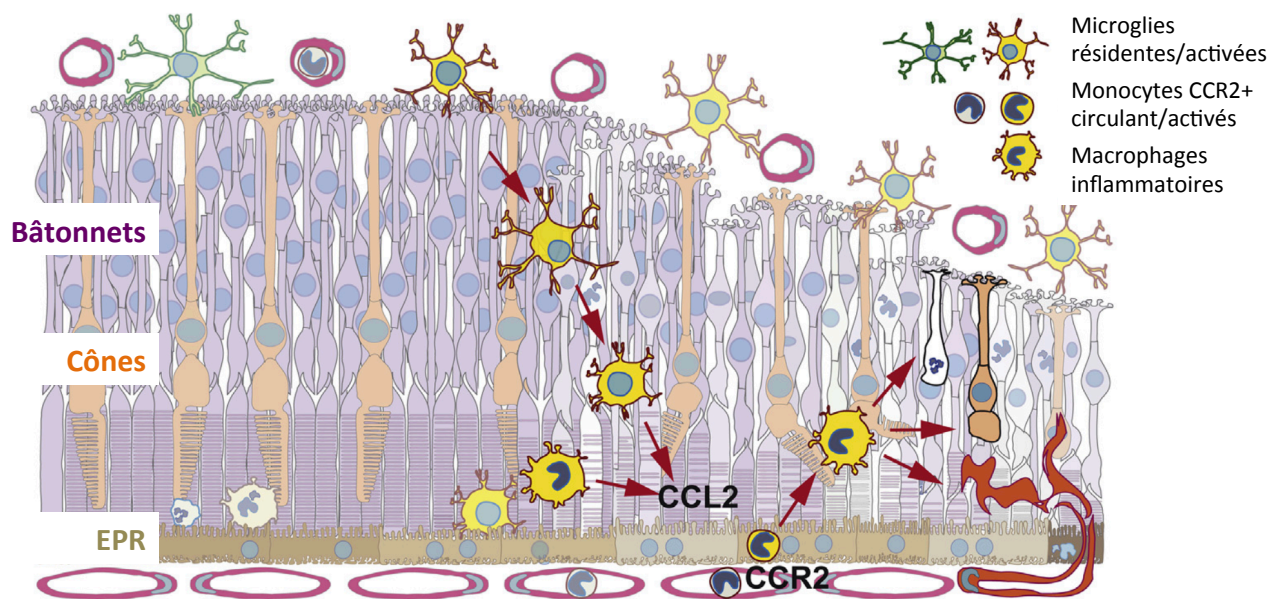


Figure 16: L'accumulation de macrophages inflammatoires est associée à la dégénérescence rétinienne. Chez les patients présentant une DMLA atrophique ou néo-vasculaire, les macrophages activés sur-expriment la chimiochine CCL2, favorisant le recrutement des macrophages inflammatoires supplémentaires.

(Guillonnet et al, 2017, Progress in Retinal & Eye Research)

A cet égard, il est intéressant de noter que les patients qui présentent une atrophie géographique arborent la présence de macrophages CCR2+ au niveau des drusens, des zones de lésions atrophiques, et de leur zone de transition (Sennlaub et al., 2013). De plus, la délétion de *Ccr2* ou *Ccl2* dans des modèles d'inflammation sous-rétinienne

induite chez la souris déficiente en Cx3cr1 entraîne une diminution de 50% du nombre de macrophages sous-rétiniens, associée à une réduction de la dégénérescence des photorécepteurs (Sennlaub et al., 2013). Ces résultats montrent la contribution neurotoxique des macrophages inflammatoires recrutés de manière CCR2-dépendante (Figure 16).

La distribution normale des microglies est aussi perturbée au cours du vieillissement et dans certaines pathologies. Dans la rétine âgée, le nombre de microglies activées présentes dans la rétine externe et l'espace sous-rétinien a tendance à augmenter (Xu et al., 2008, 2009). Chez les patients, la présence de microglies est aussi associée au développement de lésions avancées liées à la DMLA (Gupta et al., 2003). De plus, dans des modèles de DMLA induits chez des souris Cx3cr1^{GFP/GFP}, la présence de microglies accumulées dans l'espace sous-rétinien a été associée à la dégénérescence de l'EPR, l'atrophie des photorécepteurs et la néo-vascularisation choroïdienne (Combadière et al., 2007). On sait que les microglies peuvent aussi participer à la dégénérescence des photorécepteurs chez les souris rd10 – qui sont des modèles de rétinite pigmentaires (Zabel et al., 2016; Zhao et al., 2015).

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que l'accumulation sous-rétinienne de microglies activées pourrait perturber l'homéostasie tissulaire, et promouvoir une inflammation chronique, conduisant à l'apparition d'altérations caractéristiques de la DMLA.

2.3.2) Rôles des facteurs de risques génétiques

Comme nous l'avons vu, la DMLA est une pathologie multifactorielle, associée à plusieurs facteurs de risque, y compris génétiques. Nous avons aussi vu que la progression de la maladie est associée à la présence de phagocytes mononucléés dans l'espace sous-rétinien, à proximité des drusens et des zones de lésion atrophique. Mais il est compliqué de déterminer si la réaction inflammatoire chronique est l'événement primaire qui induit la pathologie, ou s'il s'agit d'un événement secondaire associé à la dégénérescence. Nous proposons ici de confronter les données présentes dans la littérature avec celles publiées par notre équipe, afin d'établir un lien mécanistique entre les polymorphismes génétiques associés à la DMLA et le comportement des macrophages, et de montrer comment ces facteurs de risque affectent la fonctions des PMs.

2.3.2.1) Apolipoprotéine E

La lipoprotéine APOE est très fortement exprimée dans le cerveau et la rétine (Anderson et al., 2001). Plus précisément, APOE est produite par l'EPR (Ishida et al., 2004), et par les phagocytes mononucléés, comme les macrophages et les microglies (Levy et al., 2015a; Peri and Nüsslein-Volhard, 2008). APOE joue un rôle majeur dans l'efflux

lipidique et le transport inverse du cholestérol (Mahley et al., 2009) qui permet de reconduire au foie les lipoprotéines de haute densité pour qu'elles y soient dégradées.

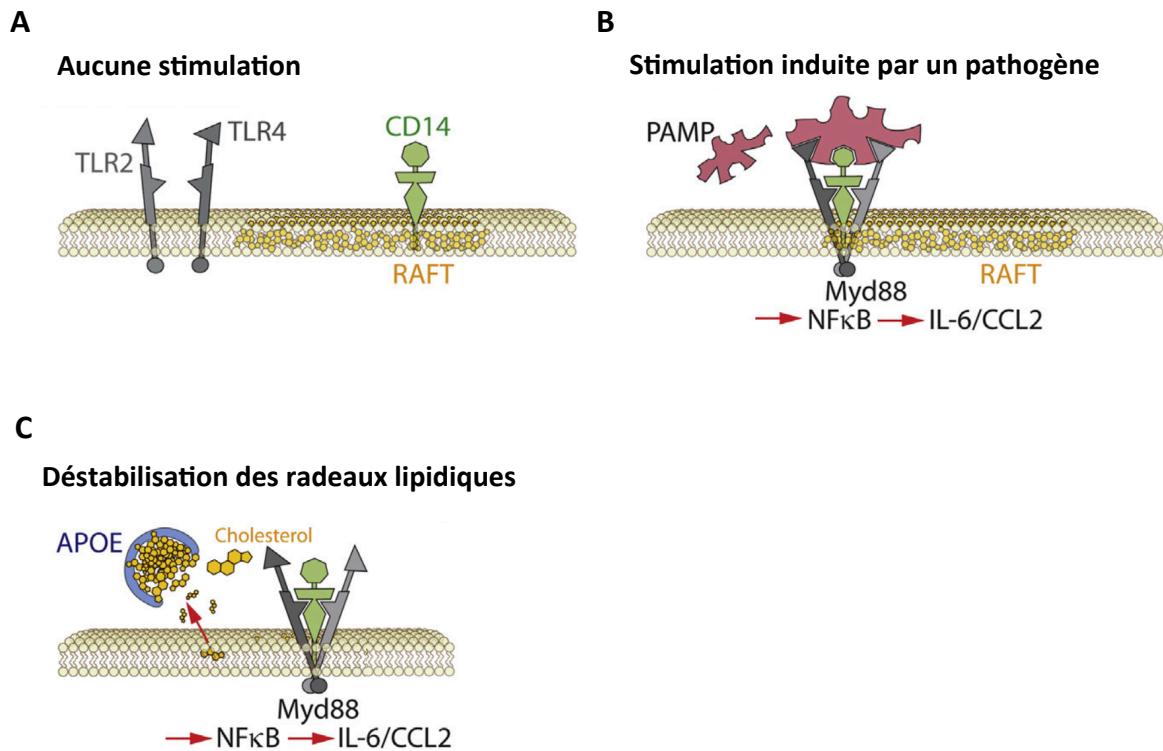


Figure 17 : Représentation schématique de l'activation du cluster de récepteurs liés à l'immunité innée (IIRC) par l'apolipoprotéine E.

Chez l'homme, le gène codant l'expression de l'Apolipoprotéine E possède trois variants génétiques : APOE2, APOE3 et APOE4. Les individus porteurs de l'allèle APOE2 présentent un risque élevé de développer une forme tardive de DMLA, alors que l'allèle APOE4 semble être un facteur protecteur (Mckay et al., 2011), contrairement à ce qui est observé dans d'autres pathologies comme la maladie d'Alzheimer (Bell et al., 2012) ou l'athérosclérose (Mahley and Rall, 2000). Dans la DMLA, les drusens larges présentent une forte accumulation d'APOE (Klaver et al., 1998), ainsi qu'une grande quantité de cholestérol extracellulaire (Curcio et al., 2001; Pikuleva and Curcio, 2014). On pourrait penser qu'un défaut du transport inverse du cholestérol serait la cause du développement des drusens, par accumulation de lipides, mais c'est l'inverse qui se produit. En effet, l'isoforme APOE4, qui dans le cerveau est associée à une baisse de la sécrétion d'APOE (Riddell et al., 2008; Sullivan et al., 2011) et à une diminution du transport inverse du cholestérol, diminue le risque de développer la DMLA (Mckay et al., 2011). L'explication de cette corrélation est liée à une particularité des phagocytes mononucléés : APOE et le cholestérol sont en effet capables influencer l'immunité innée en activant un cluster de récepteurs liés à l'immunité innée (Abrégé « IIRC ») présents à la surface des macrophages (Figure 17 A). Ce cluster est formé par les Toll-like

récepteurs TLR2 et TLR4, ainsi que leurs corécepteurs - comme CD14 - et peut induire la production de cytokines inflammatoires. Une quantité excessive d'APOE peut ainsi induire une extraction massive de cholestérol à partir des radeaux lipidiques membranaires, surpassant la séparation physiologique des récepteurs composant l'IIRC (Figure 17 C), et activant ainsi les voies de signalisation intracellulaires qui en découlent (Levy et al., 2015a; Smoak et al., 2010). Cette activation induit ensuite la production de cytokines inflammatoires, comme IL-6 qui réprime l'effet immunosuppresseur de l'EPR, favorisant la survie et l'accumulation de macrophages (Levy et al., 2015a), et CCL2 qui permet de recruter des macrophages supplémentaires via un mécanisme CCR2-dépendant (Sennlaub et al., 2013).

L'effet distinct des différentes isoformes d'APOE a été confirmé in vivo par Levy et al. L'utilisation de souris exprimant l'isoforme humaine d'APO2 (Souris TRE2) a permis de reproduire l'accumulation sous-rétinienne de macrophages via l'activation du cluster IIRC, et la production d'IL-6 et CCL2 (Levy et al., 2015b) comme observée chez la souris Cx3cr1^{GFP/GFP} (Levy et al., 2015a). L'isoforme APOE4, moins efficace pour extraire le cholestérol des radeaux lipidiques, conduit à une diminution de l'expression de CCL2, permettant une meilleure protection contre la dégénérescence induite par l'inflammation sous-rétinienne (Levy et al., 2015b).

Dans l'ensemble, ces résultats montrent la très forte association qui lie les polymorphismes APOE-dépendants et l'activation excessive du système immunitaire inné dans le développement de caractéristiques phénotypiques associées à la DMLA.

2.3.2.2) Facteur H du Complément

Le système du complément est un groupe de protéines qui interagissent en cascade, jusqu'à aboutir à son opsonisation et la formation d'un complexe d'attaque membranaire, créant des pores dans sa membrane plasmique (Sarma and Ward, 2011). Les facteurs du complément sont majoritairement synthétisés par le foie et libérés en concentrations importantes dans la circulation, mais les macrophages libèrent des sécrétions locales contenant aussi ces facteurs (Ezekowitz et al., 1984). Le facteur H du complément est une protéine appartenant à ce système, et qui est connue pour être l'un des éléments inhibant la voie alternative du complément (Zipfel and Skerka, 2009). Le CFH est exprimé par les cellules de l'EPR (Anderson et al., 2010), et est aussi fortement sécrété par les phagocytes mononucléés (Luo et al., 2011; Schlaf et al., 2001). Le CFH se lie aussi à l'intégrine CD11b/CD18, et induit entre autres la phagocytose des débris opsonisés par le CFH : cet événement n'est pas associé à la production de cytokines inflammatoires, et est un composant important de la résolution de l'inflammation (DiScipio et al., 1998; Kang et al., 2012). Le CFH est donc impliqué dans la résolution de l'inflammation.

Le risque de développer la DMLA est associé avec le polymorphisme nucléotidique rs1061170 du gène codant le CFH (Edwards et al., 2005; Hageman et al., 2005). Ce

polymorphisme conduit à une substitution d'une histidine pour une tyrosine en position 402 du domaine SCR7. Ce polymorphisme est associé aux formes tardives de la DMLA (Fritsche et al., 2013; Seddon et al., 2007), mais aussi à la forme précoce (Fritsche et al., 2014) ce qui suggère qu'il est impliqué dans un mécanisme précoce impliqué dans le déclenchement de la maladie.

Nous avons très récemment publié un article mettant en évidence un rôle assez surprenant du CFH dans la pathogénèse de la DMLA (Calippe et al., 2017). Nos résultats démontrent que la déficience en CFH chez les souris Cx3cr1^{GFP/GFP} et TRE2 inhibe complètement l'accumulation sous-rétinienne de macrophages et les dommages aux photorécepteurs qui y sont associés. Plus précisément, le CFH dérivé des macrophages inhibe la résolution de l'inflammation dans nos modèles d'inflammation sous-rétinienne induite par exposition à la lumière et transfert adoptif. Or, comme nous l'avons vu précédemment, le récepteur CD47 exprimé par les macrophages permet leur élimination grâce à l'interaction avec TSP-1. Nous montrons ici que CD47 interagit avec l'intégrine CD11b/CD18 à la surface des macrophages, et que CFH en se liant à son récepteur intégrine, prévient l'élimination des macrophages par TSP-1 (Figure 18), et donc la résolution de l'inflammation (Calippe et al., 2017).

L'ensemble de ces données suggère une fois encore qu'un polymorphisme associé à la DMLA favorise son développement via un mécanisme lié aux phagocytes mononucléés induisant la promotion d'une inflammation chronique sous-rétinienne.

2.3.2.3) ARMS2/HTRA1

De nombreuses études ont montré que plusieurs polymorphismes associés à des gènes situés sur le chromosome 10q26, comme ARMS2 ou HTRA1, sont associés avec la DMLA (Swaroop et al., 2007), bien qu'on n'en connaisse pas encore le lien de causalité (Wang, 2014).

Il semble que l'haplotype à risque soit associé à une surexpression d'HTRA1 (Yang et al., 2006). Or, la déficience en HTRA1 inhibe l'accumulation associée à l'âge de macrophages sous-rétiniens (Données non publiées), ce qui suggère que l'expression d'HTRA1 promeut l'inflammation sous-rétinienne, mais les mécanismes moléculaires précis demeurent inconnus.

De plus, l'haplotype à risque est associé à une diminution de l'expression d'ARMS2 (Données non publiées) et ARMS2 semble favoriser l'élimination des débris cellulaires par osponisation (Micklisch et al., 2017) : la déficience en ARMS2 pourrait entraîner l'accumulation de débris et favoriser aussi l'inflammation sous-rétinienne.

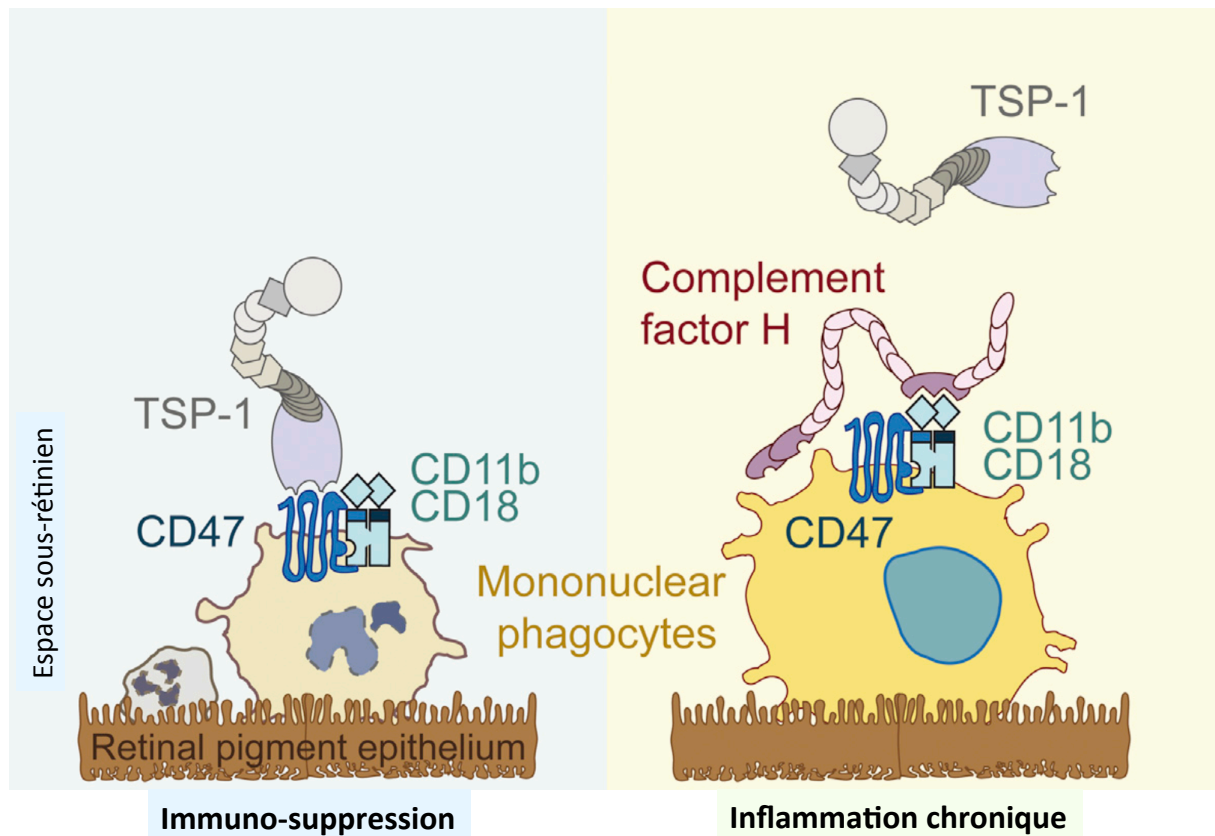


Figure 18 : Le facteur H du complément (CFH) inhibe la résolution de l'inflammation médiée par CD47.

(D'après Calippe et al, 2017, Immunity)

2.3.3) Patho-mécanismes induits par les cytokines inflammatoires

Comme nous l'avons vu précédemment, la progression de la DMLA chez l'homme est associée à l'accumulation sous-rétinienne de macrophages. Chez la souris, de nombreux modèles d'inflammation sous-rétinienne sont associés à l'accumulation de microglies activées, et de macrophages inflammatoires recrutés à partir de la population de monocytes classiques circulants exprimant de très faibles niveaux de CX3CR1. Ces populations cellulaires produisent des quantités importantes de cytokines inflammatoires, comme IL-1 β , IL-6 ou TNF- α .

2.3.3.1) IL-1 β

L'interleukine 1 bêta est une cytokine pro-inflammatoire qui joue un rôle central dans la médiation de la réponse inflammatoire à une infection ou une blessure (Dinarello, 1994). IL-1 β appartient à la famille des interleukines de type 1 : cette famille inclut 7 ligands agonistes dont IL-1 β , IL-1a, et IL-18, et 3 antagonistes dont IL-1Ra (Garlanda et

al., 2013).

L'IL-1 β est produite en quantité importante par les monocytes et les macrophages, en réponse à la stimulation des TLRs ou de récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRRs) par les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) et les motifs moléculaires associés aux signaux de danger (DAMPs), (Takeuchi and Akira, 2010). L'activation de ces récepteurs induit la production du précurseur de l'IL-1 β , la pro-IL-1 β . L'inflammasome - un complexe multi-protéique intervenant dans la maturation d'IL-1 β et IL-18 ou dans l'inactivation de l'IL-33 - prend alors en charge le processus de maturation de la pro-IL-1 β . L'échafaudage moléculaire de l'inflammasome comprend des molécules adaptatrices, des récepteurs - comme le NLRP3 - et la pro-caspase-1 (Schroder and Tschopp, 2010). L'activation de l'inflammasome induit l'activation de la caspase-1, qui à son tour clive la pro-IL-1 β (Thornberry et al., 1992), permettant la production d'IL-1 β mature qui est ensuite sécrétée (Brough and Rothwell, 2007).

L'IL-1 β est impliquée dans les mécanismes favorisant la progression de la DMLA exsudative en induisant la survie des cellules endothéliales et l'activation de gènes appartenant au répertoire génétique contrôlé par le VEGF (Schweighofer et al., 2009). L'inhibition d'IL-1 β prévient le développement de la néo-vascularisation choroïdienne (Lavalette et al., 2011), et la production d'IL-1 β active des mécanismes neurotoxiques associés à de nombreuses pathologies cérébrales (Simi et al., 2007; Yamasaki et al., 1995). Dans l'inflammation sous-rétinienne induite chez la souris déficiente en Cx3cr1, la dégénérescence des photorécepteurs est associée à la production accrue d'IL-1 β par les phagocytes mononucléés activés (Sennlaub et al., 2013). En effet, les macrophages déficients en Cx3cr1 sont insensibles au signal inhibiteur induit par la fractalkine, et libèrent une grande quantité d'ATP qui induit l'activation constitutive de leurs récepteurs P2RX7 - eux aussi surexprimés (Hu et al., 2015). La stimulation de ces récepteurs active à son tour l'inflammasome, ce qui augmente la sécrétion d'IL-1 β . Le lien mécanistique unissant la production d'IL-1 β à la dégénérescence des photorécepteurs est le sujet de cette thèse, et certaines hypothèses seront évoquées au chapitre « 3.2.1.3 La production d'IL-1 β induit indirectement la mort neuronale ».

2.3.3.2) TNF- α

La production de TNF- α est liée à la progression de la DMLA exsudative. Les patients dont les monocytes expriment de grandes quantités de TNF- α démontrent une plus haute prévalence de néo-vascularisation choroïdienne (Cousins et al., 2004) et l'inhibition du TNF- α réduit la formation des néo-vaisseaux induite par impact-laser (Shi et al., 2006). De plus, la concentration plasmatique en TNF- α augmente avec l'âge chez les patients (Bruunsgaard et al., 2000).

La production de TNF- α par des macrophages activés impacte l'homéostasie de l'EPR (Figure 19), en réprimant l'expression du facteur de transcription orthodenticle homeobox 2 (OTX2), ainsi que des gènes dont il contrôle l'expression, comme celui de la

rétinal déshydrogénase 5 (RDH5) (Mathis et al., 2017). OTX2 contrôle en effet des gènes cruciaux dans la régulation du cycle visuel du rétinale (Housset et al., 2013). Or, la DMLA précoce est associée à un temps de récupération plus important après éblouissement, ce qui suggère que le cycle visuel est ralenti, avant l'apparition de la dégénérescence rétinienne (Owsley et al., 2001). On peut donc penser que les phagocytes mononucléés qui s'accumulent au stade maculopathie à proximité des drusens pourraient induire un ralentissement du cycle visuel. Enfin, certaines données non publiées par notre équipe indiquent que l'exposition chronique de l'EPR au TNF- α suffit à induire de graves modifications morphologiques similaires à celles observées dans la DMLA (Touhami et al, 2018 : article soumis).

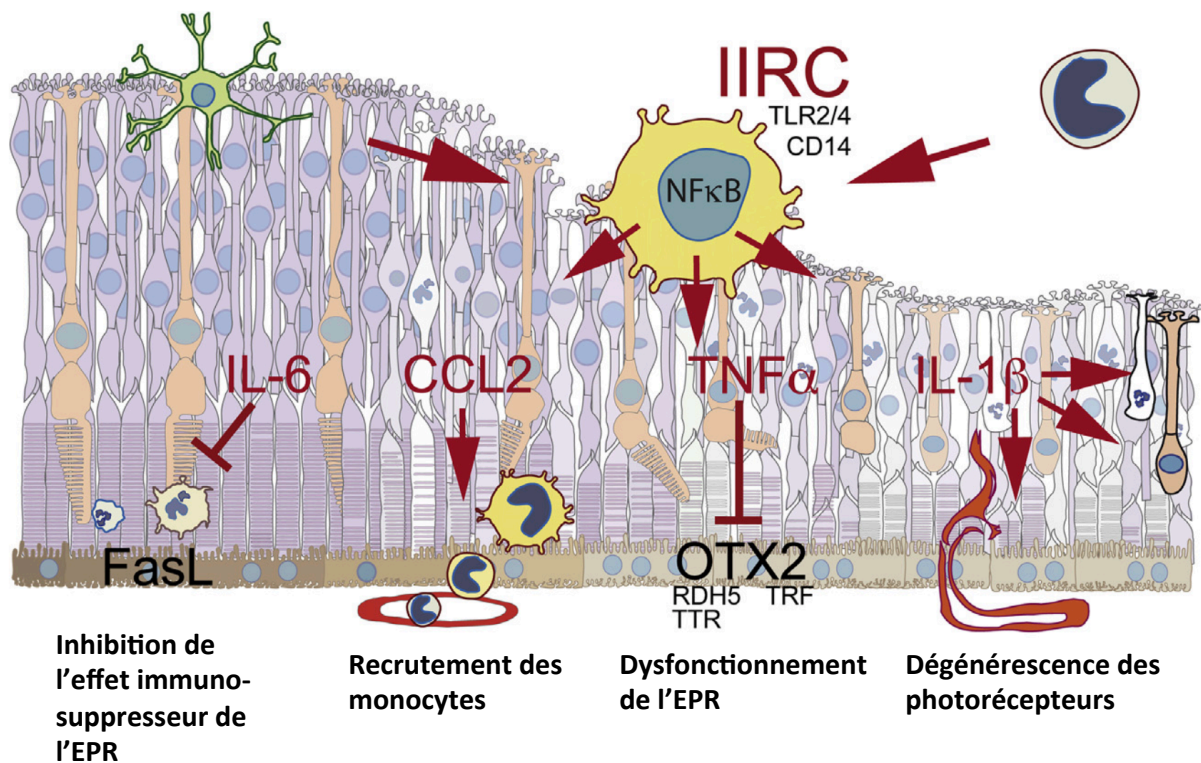


Figure 19 : La production de cytokines inflammatoires par les phagocytes mononucléés induit le dysfonctionnement et la dégénérescence de la rétine externe.

2.3.3.3) IL-6

Comme le TNF- α , la production d'IL-6 par les macrophages contribue à la néovascularisation choroïdienne (Izumi-Nagai et al., 2007; Levy et al., 2015a). De plus, les patients atteints par la DMLA exsudative présentent un pourcentage plus élevé de monocytes circulants exprimant IL-6 (Lechner et al., 2017). Mais l'IL-6 joue aussi un rôle essentiel sur le privilège immunitaire de l'œil : dans l'inflammation sous-rétinienne, IL-6

réduit l'expression de FasL (Figure 19), favorisant l'accumulation de phagocytes mononucléés sous-rétiens (Levy et al., 2015a). Les macrophages de souris déficientes en Cx3cr1 ou de souris TRE2 produisent des niveaux élevés d'IL-6, ce qui explique l'infiltration excessive de macrophages observées dans les modèles d'inflammation sous-rétinienne (Levy et al., 2015a, 2015b). Ces résultats suggèrent que l'inhibition d'IL-6 dans le cadre de la DMLA pourrait favoriser la résolution de l'inflammation en restaurant les fonctions du privilège immunitaire de l'espace sous-rétinien.

III) Neuro-immunité de la DMLA atrophique

Dans ce chapitre, nous développerons une vision globale des mécanismes reliant la production de cytokines – par les macrophages sous-rétiens – aux désordres physiologiques affectant (i) l'épithélium pigmentaire et (ii) la rétine neurale, et plus particulièrement les photorécepteurs, qui sont les deux populations cellulaires les plus affectées lors de l'atrophie géographique.

3.1) Dégénérescence de l'EPR

3.1.1) Généralités

Avec l'âge et l'exposition ininterrompue aux stress environnementaux, l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) présente de plus en plus de dysfonctionnements. Chez certains patients, l'EPR dégénère, et cette dégénérescence joue un rôle central dans la forme sèche de la DMLA, ou géographie atrophique. Tous les mécanismes qui impactent la survie de l'EPR ou l'ordre dans lequel ils surviennent n'ont pas été totalement élucidés, mais il apparaît nettement que le stress oxydant et l'inflammation jouent un rôle majeur dans cette dégénérescence. Identifier la nature des perturbations qui déstabilisent l'intégrité de l'EPR est essentiel pour comprendre l'enchaînement des patho-mécanismes conduisant à l'apparition de la forme clinique de la DMLA sèche. Dans cette partie, nous traiterons dans un premier temps les modifications histopathologiques de l'EPR induites par le stress oxydant, puis par les cytokines inflammatoires, et plus particulièrement l'IL-1 β .

3.1.2) Impact du stress oxydant sur l'EPR

Chez les patients qui présentent une DMLA précoce, les cellules de l'EPR présentent une forme atypique, élargie, et sont plus nombreuses à être multi-nucléées (Starnes et al., 2016). Ces caractéristiques pourraient être dues à des fusions cellulaires, ou un défaut lors de la division cellulaire – qui est réactivée dans le cadre de la dégénérescence. Or,

certaines études ont montré que la phagocytose des segments externes – riches en acides gras polyinsaturés - oxydés entraîne la production de stress oxydant, induisant une réplication incomplète des cellules de l'EPR (Ach et al., 2014; Chen et al., 2016) : ce mécanisme pourrait expliquer la présence accrue de cellules multi-nucléées chez les patients atteints de DMLA.

Effectivement, l'EPR est constamment soumis à un stress oxydatif important, dû à son environnement et à ses fonctions. C'est son activité métabolique, associée à la présence de nombreuses mitochondries fournissant l'énergie nécessaire au fonctionnement de l'EPR (Strauss, 2005), qui génère une quantité particulièrement élevée de radicaux libres et réactifs intermédiaires de l'oxygène (ROS). Pendant la phagocytose des segments externes par exemple, les phagosomes génèrent de l'eau oxygénée via l'activité des NADPH oxydases, de même que les peroxyosomes après bêta-oxydation des lipides provenant des photorécepteurs (Miceli et al., 1994; Tate et al., 1995). De plus, le stress photo-oxydatif causé par l'absorption de la lumière génère lui aussi une quantité extrêmement importante de ROS : ce type de stress a d'ailleurs été corrélé avec l'apparition de dommages occasionnés à la rétine et à l'EPR (Ham et al., 1978). De manière plus générale, on peut aussi relier l'étiologie de la DMLA à l'explosion de l'augmentation de la production de ROS, via la consommation de cigarettes par exemple. En conditions physiologiques, l'EPR a à sa disposition toute une batterie d'outils antioxydants qui devraient lui permettre de lutter contre les dommages oxydatifs. L'un des plus importants mécanismes mis en place est la cascade de signalisation contrôlée par le facteur de transcription Nrf2. Le Nrf2 régule un programme transcriptionnel qui permet de moduler l'homéostasie des systèmes redox, en protégeant ainsi les cellules de l'EPR (Nguyen et al., 2003). Malheureusement, il semblerait que ce système ne soit plus fonctionnel chez les patients atteints de DMLA. L'âge et la cigarette impactent négativement la production de l'ARNm et la protéine Nrf2, entravant tout le programme transcriptionnel qui se trouve en aval (Suzuki et al., 2008). Des études réalisées chez la souris âgée ont pu montrer l'inefficacité de la réponse Nrf2 après un challenge de stress oxydant (Sachdeva et al., 2014). Ces modèles sont néanmoins insuffisants pour induire chez le rongeur une dégénérescence de l'EPR comme on peut l'observer chez les patients, et tout porte à croire quand dans des stades avancés de DMLA, plusieurs mécanismes cyto-protecteurs sont probablement affectés.

3.1.3) Impact des cytokines inflammatoires, et notamment de l'IL-1 β

Comme nous avons pu le voir, la forme avancée de DMLA sèche est associée à une forte accumulation sous-rétinienne de macrophages pro-inflammatoires. Ces macrophages jouent un rôle pathogène, comme cela a été montré dans de nombreux modèles d'inflammation sous-rétinienne et de DMLA. Ces cellules produisent de grandes quantités de médiateurs pro-inflammatoires, comme l'IL-1 β , l'IL-6, le CCL2 ou le TNF- α .

Ces cytokines peuvent induire des effets toxiques au niveau de la rétine, comme nous le verrons dans le prochain chapitre, mais aussi sur les cellules de l'EPR.

En premier lieu, les macrophages sont recrutés au niveau des drusens, probablement pour participer à l'élimination des déchets lipidiques accumulés, et de débris cellulaires de l'EPR, asphyxié par l'accumulation de déchets. En théorie, l'effet immunosuppresseur de l'EPR devrait permettre l'élimination des phagocytes mononucléés afin d'éviter qu'ils s'accumulent. Dans un modèle de co-culture, les phagocytes mononucléés activés ont la capacité d'impacter le fonctionnement de l'EPR, en down-régulant l'expression d'OTX2 via la production de TNF- α - OTX2 étant un facteur de transcription qui régule des gènes essentiels à la fonction de l'EPR – favorisant ainsi leur survie au niveau de l'espace sous-rétinien (Mathis et al., 2017).

L'activation de l'inflammasome semble aussi être impliquée dans la pathogénèse de la DMLA sèche. L'inflammasome est un complexe mutli-protéique, qui réagit à différents signaux de danger, et permet la synthèse et la maturation d'IL-1 β et d'IL-18 (Martinon et al., 2002), ainsi que l'inactivation d'IL-33 (Cayrol and Girard, 2009). De nombreux facteurs peuvent activer l'inflammasome, comme le stress oxydant (Dostert et al., 2008) ou des composants de la cascade du complément. Plusieurs études montrent que la production d'IL-18 – qui découle de l'activation de l'inflammasome - est associée au développement de l'atrophie géographique (Tarallo et al., 2012) : IL-18 induit même l'apoptose des cellules de l'EPR, via l'activation de la caspase-8, soumise à un mécanisme dépendant de Fas ligand (Kim et al., 2014).

Sans aucun doute, l'activation du complexe de l'inflammasome a un objectif initial protecteur, comme la plupart des réactions inflammatoires. Le fait qu'il devienne pathologique dans le cadre de la DMLA peut être dû à plusieurs facteurs. (i) L'équilibre entre la production d'IL-1 β et d'IL-18 joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'inflammation. L'IL-18 est capable de limiter et contenir les effets pro-inflammatoires de l'IL-1 β : c'est par exemple le cas dans le cadre des infections gastriques, afin d'éviter d'endommager les cellules épithéliales (Hitzler et al., 2012). On peut imaginer qu'un déséquilibre dans la production de ces cytokines pourrait favoriser l'installation de l'inflammation de manière durable dans l'atrophie géographique. (ii) D'autre part, Doyle et al ont montré que l'augmentation de la production d'IL-18 due à l'activation de l'inflammasome permettait de prévenir la néo-vascularisation dans un modèle de DMLA aigue (Doyle et al., 2012), alors qu'à l'inverse, IL-18 semble contribuer à la mort des cellules de l'EPR dans un modèle chronique de géographie atrophique (Tarallo et al., 2012). Ces différences pourraient s'expliquer par la nature et la durée du stimulus initial, impactant finalement l'équilibre entre IL-1 β et IL-18. Ainsi, dans un certain contexte, la production d'IL-1 β perturberait cet équilibre, et favoriserait le développement d'un environnement pro-inflammatoire délétère.

3.2) Toxicité neuronale induite par les cytokines inflammatoires

La neuro-inflammation définit un ensemble de processus inflammatoires chroniques déclenchés par un stress initial – une blessure, une infection, une maladie auto-immune – et qui ne parvient pas à une résolution. Elle met en jeu différents facteurs de signalisation, qui agissent sur une grande variété de cellules différentes – glie, neurones, système immunitaire – qui participent à une réaction en chaîne qui, si elle n'est pas stoppée, aboutit à la mort neuronale.

Une vision relativement globale de ces mécanismes a émergé grâce aux travaux réalisés au cours de ces dernières années : on sait ainsi que la production de facteurs neurotrophiques et de chemokines est plutôt favorable à la survie neuronale (Seki et al., 2004), alors que les réactifs intermédiaires de l'oxygène (Annunziato et al., 2003) ou les cytokines (Holmin and Mathiesen, 2000) ont plutôt tendance à induire la mort neuronale par apoptose ou par nécrose.

Dans cette partie, nous verrons essentiellement comment le glutamate est étroitement impliqué dans ces mécanismes neurotoxiques, mais aussi comment le stress oxydant et la perturbation des communication intercellulaires contribuent au phénotype global impliqué dans les pathologies neuro-dégénératives, et dans quelle mesure ces conclusions peuvent être étendues ou appliquées à la DMLA atrophique.

3.2.1) Glutamate

3.2.1.1) Généralités sur le glutamate

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur prédominant dans la système nerveux central : il participe à la transmission du message nerveux tout au long de la chaîne de perception visuelle qui traverse la rétine. Les interneurons rétiniens (Cellules amacrines et horizontales) utilisent eux le plus souvent des messagers chimiques ayant un potentiel post-synaptique inhibiteur, du type glycine ou acide γ -aminobutyrique (GABA), afin de moduler l'intégration du signal nerveux par inhibition latérale.

Dans cette partie, nous nous focaliserons sur les particularités de l'homéostasie du glutamate au niveau de la rétine externe.

3.2.1.1.1) Le cycle du glutamate

Le glutamate est produit par les photorécepteurs pré-synaptiques à partir de glutamine : et est ensuite stocké au fur et à mesure dans des vésicules. Ce sont les VGLUTs – ou transporteurs vésiculaires du glutamate - qui permettent de faire transiter le glutamate du compartiment cellulaire à l'intérieur des vésicules synaptiques. A la suite d'un

potentiel d'action, leur contenu est libéré au niveau des terminaisons nerveuses directement dans la synapse.

3.2.1.1.1.1) Transporteurs du glutamate

Après fixation à ses récepteurs post-synaptiques, le glutamate est rapidement capturé par les cellules macrogliales via des transporteurs dédiés, afin d'éviter d'atteindre une concentration extracellulaire neurotoxique. Notons ici que les cellules gliales de Müller ne sont pas les seules à exprimer ces transporteurs : l'ensemble des cellules neuronales et gliales rétinienne expriment des transporteurs de haute-affinité au glutamate (Rauen and Wiessner, 2000). Ainsi, les cellules bipolaires, horizontales et les photorécepteurs expriment les transporteurs au glutamate EAAT2 (GLT-1), EAAT3 (EAAC1) et EAAT5. En résumé,

Il existe en fait deux catégories de transporteurs au glutamate : les canaux dont le fonctionnement dépend d'un gradient électrochimique de Na⁺ dits EAATs, et les autres. Les transporteurs vésiculaires VGLUTs – qui fonctionnent selon un gradient de protons et dont le rôle ne sera pas détaillé ici – les transporteurs électroneutres ASCT1 et ASCT2, ainsi que le système x_c⁻ - un échangeur glutamate/cystine - appartiennent à la deuxième catégorie.

3.2.1.1.1.1.1) EAATs

Structure : Les EAATs (Excitatory Amino Acid Transporter) sont des transporteurs électrogéniques secondaires dont la structure topologique comprend 8 domaines transmembranaires et deux épingles à cheveux β (Grunewald and Kanner, 2000).

Electrophysiologie : L'étude des conditions stoechiométriques de l'échange anionique réalisé par le transporteur EAAT a permis de déterminer que le passage d'une molécule de glutamate est possible grâce au co-transport de trois ions Na⁺ et un proton H⁺ en échange de la libération d'un ion K⁺ (Zerangue and Kavanaugh, 1996) (Figure 20). Il est intéressant de noter que les EAATs ont également une capacité de transport inversé (Watzke and Grewer, 2001) dans certaines conditions non-physiologiques - comme dans l'ischémie cérébrale -, et ainsi contribuer à l'établissement de conditions excitotoxiques (Rossi et al., 2000).

Membres : La famille des EAATs comprend aujourd'hui 5 membres : EAAT1 (Ou GLAST, le transporteur glutamate-aspartate), EAAT2 (Ou GLT-1), EAAT3 (Ou EAAC-1), EAAT4 et EAAT5. Ces protéines sont respectivement codées par les gènes *Slc1a3*, *Slc1a2*, *Slc1a1*, *Slc1a6*, et *Slc1a7*.

Localisation : Dans la rétine, l'expression de ces transporteurs a été identifiée par Eliasof et al (Eliasof et al., 1998) et l'expression d'EAAT5 semble à priori être exclusive à la rétine chez les vertébrés (Arriza et al., 1997). Alors que l'expression d'EAAT1 est restreinte à la cellule gliale de Müller (Lehre et al., 1997), on retrouve une répartition plus spécifique de l'expression des autres EAATs. EAAT2 est exprimé par les photorécepteurs, les cellules de Müller et les cellules bipolaires (Rauen and Kanner, 1994), EAAT3 par les neurones de la rétine interne (Schultz and Stell, 1996), EAAT4 par les astrocytes (Ward et al., 2004) et les segments externes des photorécepteurs (Pignataro et al., 2005), et EAAT5 par les photorécepteurs en bâtonnets, les bipolaires et les cellules de Müller (Arriza et al., 1997; Eliasof et al., 1998).

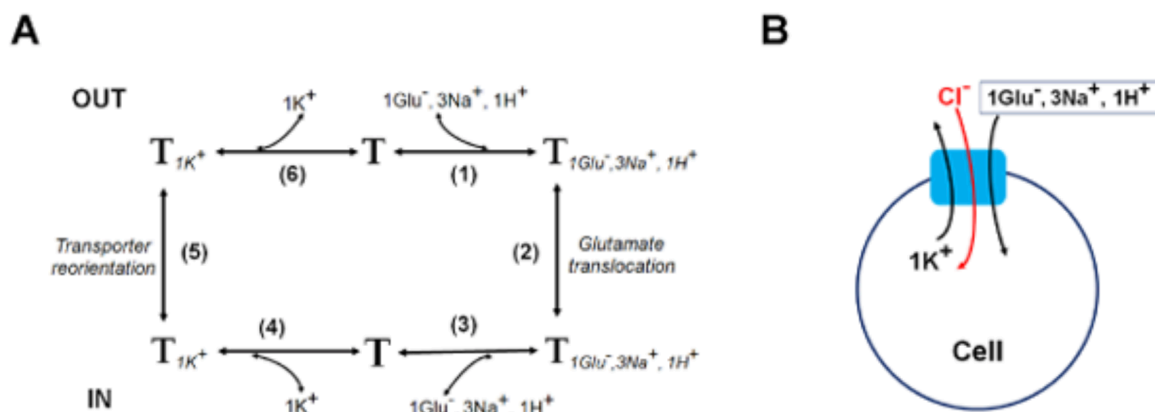


Figure 20 : Cycle de transport et stoechiométrie des EAATs. (A) Diagramme simplifié du cycle de transport des EAATs. Le glutamate se lie au transporteur (T), est transloqué, puis libéré dans le cytosol. Le K⁺ se lie alors du côté intracellulaire, réoriente le transporteur, et K⁺ est libéré en extracellulaire. (B) Schéma représentant la stoechiométrie des EAATs.

(D'après Jiang et al, 2011, Neuropharmacology)

Fonction : Que ce soit dans le cerveau ou la rétine, le rôle des EAATs est clairement établi: les transporteurs au glutamate permettant de capturer le glutamate extracellulaire libéré au niveau des synapses, assurant ainsi un contrôle précis de la transmission synaptique excitative.

Concernant la cellule de Müller : Dans la rétine, la cellule gliale de Müller est responsable de la plupart de la capture de glutamate extracellulaire. Là où 90% de la capture de glutamate dans le cerveau est assurée par le transporteur EAAT2/GLT-1 (Tanaka et al., 1997), c'est EAAT1/GLAST qui joue un rôle majeur au sein du tissu rétinien (Rauen, 2000). Chez la souris, la cellule de Müller assure 50% de la capture du glutamate par GLAST, 40% via des transporteurs électro-neutres Na⁺-dépendant, et 10% via d'autres transporteurs ou échangeurs Na⁺-indépendants (Sarthy et al., 2005). La présence d'autres membres de la famille EAAT au niveau de la cellule de Müller a aussi été relevée chez d'autres espèces (Rauen, 2000).

Malgré le rôle essentiel qu'ils jouent en conditions physiologiques, les EAATs ne sont définitivement pas les seuls transporteurs qui régulent l'homéostasie du glutamate, certains ayant un effet inverse. Le système x_c^- - un échangeur cystine/glutamate - a notamment été impliqué par de nombreuses études dans la mise en place de mécanismes neurotoxiques dévastateurs.

3.2.1.1.1.2) Le système x_c^-

Le système x_c^- est un co-transporteur de type anti-porteur présent à la membrane plasmique (Sato et al., 1995). Il fonctionne comme un transporteur électro-neutre, permettant le transport d'une molécule de cystine contre une molécule de glutamate, avec une stoechiométrie de 1:1, indépendamment du gradient de Na^+ (Sato et al., 1999). Ce système peut théoriquement fonctionner dans les deux sens (Bannai, 1986) : mais le pool intracellulaire de cystine étant restreint car elle est très rapidement réduite en cystéine, et la concentration extracellulaire en glutamate étant généralement plus élevée qu'en intracellulaire, le système x_c^- fonctionne quasi-systématiquement dans le sens où la cystine est importée via l'exportation de glutamate. Le système x_c^- est composé de deux sous-unités, une chaîne lourde 4F2hc qui lie le transporteur à la membrane plasmique (Bassi et al., 2001), et une chaîne légère xCT. C'est la chaîne légère (Figure 21 A), dont l'expression est codée par le gène *Slc7a11*, qui confère sa spécificité au transporteur x_c^- .

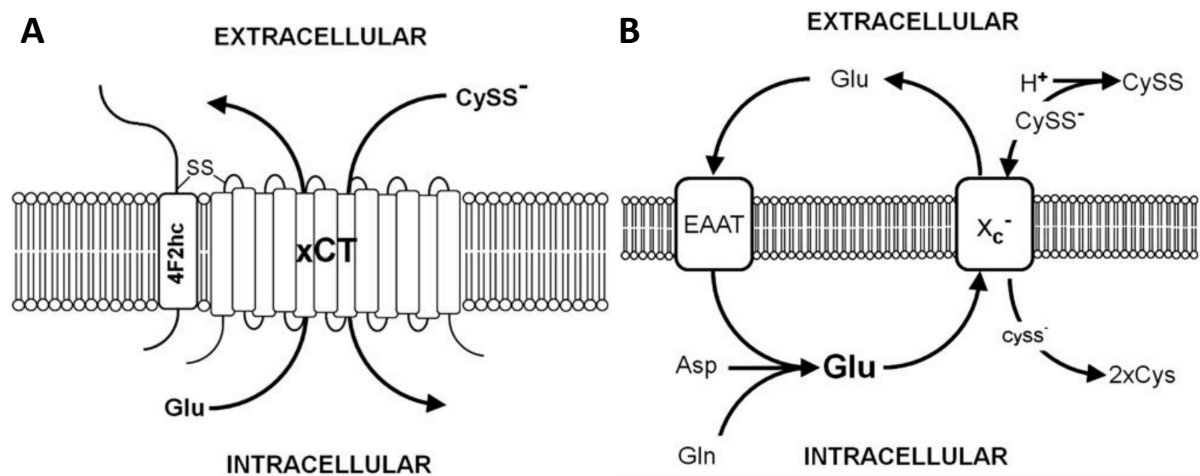


Figure 21 : Représentation schématique du système x_c^- . (A) Le système x_c^- est composé d'une chaîne lourde 4F2hc, et d'une chaîne légère xCT. (B) Le système x_c^- importe la cystine en échange du glutamate, recapté par les transporteurs EAATs.

(D'après Lewerenz et al, 2011, Antioxidants et Redox Signaling)

Le système x_c^- joue un rôle absolument vital dans la protection des cellules contre le stress oxydant : en effet, l'importation de cystine est nécessaire pour la production de glutathion (GSH) - un antioxydant majeur (Lewerenz et al., 2006a; Shih et al., 2006). En contrepartie, le relargage de glutamate - requis pour permettre la capture de cystine -

tend à accroître la concentration extracellulaire de glutamate, favorisant ainsi l'apparition de conditions excitotoxiques pour les neurones : c'est pourquoi l'expression et l'activité du système x_c^- doivent être très finement régulées. Il a été montré à plusieurs reprises qu'une activité/fonction aberrante de l'échangeur cystine/glutamate favorisait l'excitotoxicité dans le cadre de certaines pathologies neurodégénératives (Kigerl et al., 2012).

Système x_c^- et rétine : Chez la souris, l'ARNm xCT est exprimé au niveau de plusieurs organes, notamment – et de manière robuste – au sein des tissus qui composent le système nerveux central, le cerveau et la rétine (Burdo et al., 2006; Dun et al., 2006). Plus particulièrement, l'expression rétinienne du système x_c^- semble restreinte aux cellules gliales de Müller (Kato et al., 1993), aux macrophages résidents et aux photorécepteurs en cônes et en bâtonnets (Hu et al., 2008), où x_c^- participe à la libération synaptique non-vésiculaire de glutamate.

Le système x_c^- est actif dans la rétine. En effet, l'injection intravitréenne de DL- α -amino adipate – un inhibiteur du système x_c^- – entraîne une diminution de la concentration rétinienne en GSH (Glutathion), et induit un dysfonctionnement de la rétine (Kato et al., 1993). Ce résultat montre que le système x_c^- est fonctionnellement important pour la rétine.

Régulation transcriptionnelle : L'expression transcriptionnelle de xCT est notamment régulée par l'activation des AREs en réponse à Nrf2 (Sasaki et al., 2002). Sa surexpression est liée à une augmentation de l'activité du système x_c^- corrélée à un accroissement du taux intracellulaire de glutathion (Shih et al., 2003). En conditions physiologiques, Nrf2 est rapidement dégradé par le protéasome, car il interagit avec Keap1, une protéine adaptatrice Nrf2-spécifique reconnue par le complexe ubiquitine ligase Cul3 (Kobayashi et al., 2004; McMahon et al., 2003) : la transcription de gènes dont l'expression est contrôlée par Nrf2 est ainsi inhibée. Dans un contexte associé à une augmentation du stress oxydant, ou toute autre situation qui entraîne l'activation de la réponse cellulaire intégrée au stress (ISR), le facteur de transcription Nrf2 est transloqué au noyau. Là, en présence de petites protéines Maf, il se lie à des séquences régulatrices de type ARE, entraînant la surexpression des gènes qui y sont associés (Cullinan et al., 2003). Ces séquences ARE, appelées éléments de réponse antioxydant, sont des séquences régulatrices qui contrôlent l'expression des gènes antioxydants et cytoprotecteurs. Il est intéressant de noter que Nrf2 n'est pas le seul régulateur de xCT, et que l'activité d'ATF4 – un facteur de transcription dépendant du système ISR – est aussi liée à l'expression d'xCT (Sato et al., 2004), ainsi que d'autres protéines régulatrices dont l'activité est associée à un mécanisme protecteur contre certaines pathologies neuro-dégénératives.

Fonction physiologique : Dans des cellules matures en culture, les neurones présentent une faible activité du système x_c^- , alors que dans les astrocytes, le système x_c^- est très actif (Lobner, 2009). Les astrocytes sont capables de relarguer GSH et cystéine afin de

réguler l'état redox du tissu cérébral, grâce à leurs capacités antioxydantes (Dringen and Hirrlinger, 2003; Wang and Cynader, 2000). Shih et al ont montré que la surexpression de xCT dans les astrocytes permet d'augmenter la production de glutathion, et d'ainsi protéger les neurones contre le stress oxydant (Shih et al., 2006). Certes, le système x_c⁻ favorise la production de composés antioxydants via l'importation de cystine, mais la libération de glutamate qui se fait en contrepartie peut avoir un effet néfaste si elle est excessive. Dans certains modèles, l'augmentation de l'activité du système x_c⁻ est corrélée à une mort neuronale. Dans certains types de cancers comme le gliome, la mort neuronale est associée à une importante libération de glutamate via le système x_c⁻ (Chung et al., 2005); dans la maladie d'Alzheimer, ce sont les microglies qui, après avoir été exposées aux peptides A β , s'avèrent exercer un effet neurotoxique causé par la libération trop importante de glutamate (Qin et al., 2006).

En effet, l'activité du système x_c⁻ au niveau des microglies peut être toxique pour les cellules environnantes – et notamment les oligodendrocytes (Domercq et al., 2007). De même, des macrophages activés par le LPS sont en mesure de libérer assez de glutamate via le système x_c⁻ pour induire l'apoptose neuronale (Piani and Fontana, 1994). Dans le système rétinien, certaines données pointent aussi le rôle joué par les cellules gliales dans la neurotoxicité.

En conclusion, le rôle joué par le système x_c⁻ est celui d'une épée à double-tranchant, et peut avoir des effets bénéfiques ou négatifs. D'un côté, en cas de stress oxydant intense, l'augmentation de l'activité du système x_c⁻ permet d'augmenter la capture de cystine, et d'ainsi approvisionner la machinerie antioxydante. A l'inverse, si les cellules sont soumises à un stress excitotoxique, augmenter l'activité du système x_c⁻ et accroître la libération de glutamate pourrait avoir un effet destructeur.

3.2.1.1.1.2) Müller et photorécepteurs

Comme nous l'avons vu, les cellules gliales ont à leur disposition toute une batterie de transporteurs au glutamate, afin de permettre un nettoyage efficace de l'espace synaptique, et éviter une accumulation toxique du glutamate. Dans la rétine, les cellules gliales de Müller expriment fortement la glutamine synthétase, ou enzyme GS, qui permet l'amidation du glutamate, afin de le transformer en glutamine, molécule non-neurotoxique (Riepe and Norenburg, 1977). La glutamine est alors relarguée pour être ensuite captée par les neurones glutaminergiques pré-synaptiques, les photorécepteurs dans notre cas (Figure 22). Ces neurones pourront alors hydrolyser la glutamine grâce à l'enzyme glutaminase, produisant ainsi le glutamate, ce qui boucle le cycle neuro-glial glutamine/glutamate (Poitry et al., 2000).

3.2.1.1.2) Les récepteurs au glutamate

Le glutamate étant le neurotransmetteur exciteur majeur du système nerveux central chez les mammifères, les récepteurs au glutamate jouent un rôle absolument central dans la transmission synaptique. Il existe deux types de récepteurs au glutamate : (i) les récepteurs ionotropiques, qui permettent la transmission de l'influx nerveux, et (ii) les récepteurs métabotropiques, dont le rôle est de moduler la transmission synaptique et l'excitabilité neuronale.

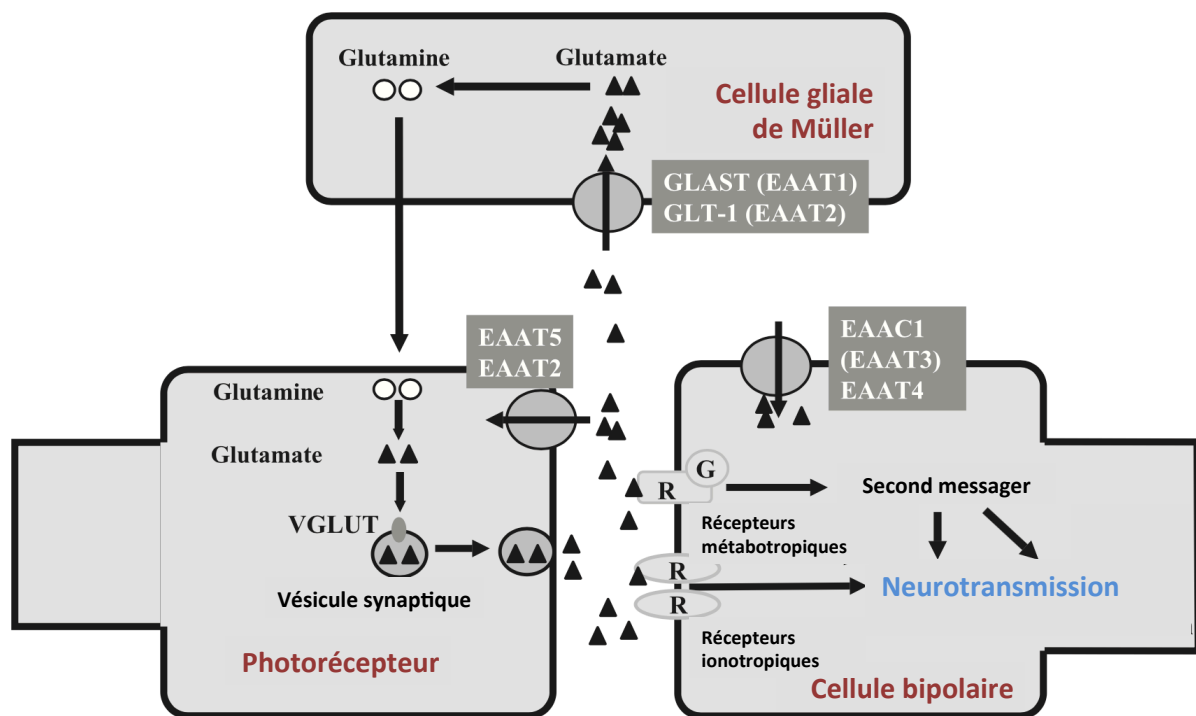


Figure 22 : Le cycle rétinien du glutamate - Régulations à l'échelle des photorécepteurs. Au niveau des photorécepteurs, le glutamate est chargé dans les vésicules synaptiques grâce aux transporteurs VGLUT. Lors de la transmission synaptique, le contenu de ces vésicules est libéré dans l'espace inter-synaptique : le glutamate se lie alors aux récepteurs exprimés par la cellule bipolaire, induisant la neurotransmission. L'excès extracellulaire de glutamate est recapté via les transporteurs EAATs, majoritairement par les transporteurs EAAT1 et EAAT2 exprimés par la cellule de Müller. Celle-ci métabolise alors le glutamate en glutamine, qui est renvoyée aux photorécepteurs, et à nouveau transformée en glutamate.

(D'après Shigeri et al, 2004, Brain Research Reviews)

3.2.1.1.2.1) Les récepteurs ionotropiques

Les récepteurs ionotropiques sont des récepteurs couplés à un canal ionique. Selon le type de récepteur, ce canal s'active et devient perméable aux ions Na⁺, K⁺, et parfois Ca²⁺ après liaison au glutamate. Deux catégories de récepteurs ionotropiques ont été identifiées à ce jour : les récepteurs NMDA, et les récepteurs non-NMDA – parmi lesquels on retrouve les récepteurs AMPA et kainate. Ces différents types de récepteurs sont nommés d'après leurs agonistes spécifiques.

Structurellement, les récepteurs ionotropiques sont composés de plusieurs sous-unités transmembranaires, qui s'assemblent de manière variable afin de former différentes isoformes.

Les récepteurs NMDA : Les récepteurs NMDA jouent un rôle crucial dans la communication neuronale. Ce sont des complexes d'hétéromères résultant de l'association de plusieurs sous-unités, donc il existe une grande diversité, ce qui résulte en une grande variété de NMDA-R (Paoletti et al., 2013). Chaque sous-unité confère des propriétés biophysiques et pharmacologiques uniques au récepteur. A plus large échelle, la composition des récepteurs NMDA peut avoir un impact allant de la plasticité synaptique aux mécanismes cellulaires impliqués dans les pathologies neuronales (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004), via notamment l'excitotoxicité due au glutamate – due à une grande perméabilité au Ca²⁺ (Liu et al., 2007).

Les récepteurs AMPA : Cette famille de récepteurs est majoritairement responsable de la transmission synaptique dite rapide (Raman et al., 1994). La plupart des récepteurs AMPA sont des assemblages hétéro-tétramériques composés à partir de quatre types de sous-unités GluA1-4 (Henley and Wilkinson, 2016). Cette composition aléatoire n'est pas anodine, car elle intervient dans la régulation du trafficking post-synaptique des AMPA-R, ce qui impacte la plasticité synaptique (Watson et al., 2017), ou la réponse neuronale au stress (Liu and Zukin, 2007). Les récepteurs AMPA sont perméables à différents types d'ions, comme Ca²⁺, Na⁺ et K⁺, permettant ainsi la conduction nerveuse. Il est très intéressant de noter que la perméabilité au Ca²⁺ pour ces canaux requiert l'absence de la sous-unité GluA2 sous sa forme éditée – une arginine remplaçant la glutamine en position 607 (Sommer et al., 1991) - : cela reste un événement assez rare malgré tout (Greger et al., 2002), ce qui fait du récepteur AMPA un candidat très probable pour la médiation de l'excitotoxicité (Chen et al., 1999; Vandenberghe et al., 2000).

Les récepteurs Kainate : Comme les récepteurs AMPA et NMDA, la famille des récepteurs kainate est composée de plusieurs combinaisons tétramériques réalisées à partir des différentes sous-unités GluK1-5 (Lerma and Marques, 2013), formant ainsi un canal perméable au Na⁺ et au K⁺ (Van Damme et al., 2002), ainsi qu'au Ca²⁺. Cette diversité est renforcée par l'épissage alternatif et l'édition d'ARNm (Köhler et al., 1993; Wilding et

al., 2005). La nature même du rôle des récepteurs kainate est encore assez controversée, mais ils interviennent à au moins trois niveaux : (i) la dépolarisation post-synaptique, (ii) la modulation de la libération pré-synaptique de neurotransmetteurs (Schmitz et al., 2000), et (iii) la maturation des circuits neuronaux pendant le développement (Lauri et al., 2006). Certaines études impliquent les récepteurs de type kainate dans le phénomène d'excitotoxicité induit par le glutamate (Milatovic et al., 2002).

La dimension pathologique et les mécanismes de l'excitotoxicité du glutamate causée par la sur-stimulation des différents récepteurs seront traités plus loin (1.2).

3.2.1.1.2.2) Les récepteurs métabotropiques

Les récepteurs métabotropiques au glutamate – couramment abrégés mGluRs – dont il existe huit isoformes, forment une super-famille de récepteurs synaptiques couplés aux protéines G, ou GPCRs : ce sont des récepteurs liés à la membrane plasmique. En réponse à une interaction avec leur ligand - le glutamate -, ils permettent la transduction de signaux intracellulaires via des interactions avec les protéines G. La nature de ces protéines G varie selon la sous-famille du mGluR concerné – groupe I, II ou III -, induisant ainsi différentes cascades intracellulaires de signalisation. Dans l'ensemble, les mGluRs du groupe I augmentent l'excitabilité neuronale, alors que ceux des groupes II et III ont tendance à inhiber la libération pré-synaptique de neurotransmetteurs – et seront donc exprimés par des neurones pré-synaptiques (Thompson et al., 1993).

Nous ne détaillerons pas plus le rôle de ces récepteurs, qui restent rarement associés aux pathologies neuro-dégénératives liées au glutamate : on leur attribue d'ailleurs plus couramment un rôle protecteur (Baskys et al., 2005; Colwell and Levine, 1999), de par leur activité neuro-modulatrice.

3.2.1.1.2.3) Les photorécepteurs expriment les récepteurs au glutamate

La présence de récepteurs glutamatergiques ionotropiques au niveau de la membrane plasmique de neurones pré-synaptiques peut paraître contre-intuitive, en particulier au niveau des photorécepteurs, qui sont les neurones les plus en amont de la cascade visuelle.

Cependant, cette caractéristique est bien établie dans le cerveau, où la présence de d'auto-récepteurs glutamatergiques - de type kainate notamment – au niveau de neurones pré-synaptiques - dans l'Hippocampe - permet de réguler négativement la libération de glutamate, et d'ainsi moduler l'activité post-synaptique (Chittajallu et al., 1996). D'autres études menées à partir d'échantillons cérébelleux ont montré que l'acide kainique induisait la libération de glutamate à partir de certains neurones pré-synaptiques (Ferkany et al., 1982).

Et dans la rétine, ce phénomène n'est pas inconnu non plus. Une étude réalisée chez la souris a montré avec précision l'expression et la localisation pré-synaptique de la sous-unité GluK5 – appartenant au répertoire des récepteurs kainate - au niveau des terminaisons nerveuses des photorécepteurs en bâtonnets (Haumann et al., 2017). Chez la souris toujours, Jakobs et al ont montré l'expression des récepteurs kainate par les photorécepteurs en bâtonnets (Jakobs et al., 2007). Une autre étude a identifié l'expression des sous-unités GluR6 et GluR7 – appartenant aussi au répertoire des récepteurs kainate – au niveau pré-synaptique, c'est-à-dire au niveau des terminaisons des photorécepteurs en bâtonnets, chez le primate cette fois-ci (Harvey and Calkins, 2002). D'autres auteurs ont pu mettre en évidence en microscopie électronique chez le rat la présence de sous-unités des récepteurs NMDA au niveau terminal des dendrites synaptiques de photorécepteurs (Fletcher et al., 2000).

Enfin, plusieurs articles font état d'un effet excitotoxique du glutamate sur les photorécepteurs, ce qui pousse à croire que ceux-ci expriment bien des récepteurs glutamatergiques ionotropiques. Par exemple, à partir de cellules issues d'une lignée de rétinoblastome (Y-79) différenciées en photorécepteurs, une étude a montré l'effet excitotoxique du glutamate via des mécanismes impliquant le stress oxydant (Wang et al., 2016). Une autre étude, réalisée à partir de rétines d'embryons de poulet, a aussi montré un effet toxique du glutamate sur la survie des photorécepteurs, bien que modéré par rapport aux neurones des couches plus internes de la rétine (Reif-lehrer et al., 1975). Ces résultats ont été confirmés plus tard dans une autre étude, soulignant une fois de plus l'effet discret du glutamate sur les photorécepteurs par rapport aux autres neurones rétinien, ce qui pourrait expliquer pourquoi certains auteurs ont pu choisir d'omettre de mentionner cet effet (Blanks et al., 1981). Enfin, l'étude publiée par Delyfer et al établit clairement dans un modèle de rétinite pigmentaire – chez la souris *rd1* – que l'inhibiteur CNQX permet de protéger les bâtonnets de la dégénérescence dans un contexte où le glutamate extracellulaire s'accumule, suggérant ainsi l'existence d'un phénomène excitotoxique dirigé contre les photorécepteurs (Delyfer et al., 2005).

3.2.1.2) Toxicité du glutamate

Comme nous l'avons vu, le glutamate est un puissant neurotransmetteur excitateur qui permet en conditions physiologiques la transmission du message nerveux, mais qui dans certaines conditions pathologiques peut être toxique pour les neurones.

3.2.1.2.1) Excitotoxicité du glutamate

3.2.1.2.1.1) Définition

Lucas et al ont observé dès les années 50 qu'une concentration extracellulaire excessive en glutamate crée un phénomène excitotoxique chez les neurones, entraînant leur mort (Lucas and Newhouse, 1957; Olney, 1969). En règle générale, il était admis que l'excitotoxicité est due à une libération synaptique excessive de glutamate. Mais des études plus récentes ont mis en évidence la contribution d'autres populations cellulaires – comme les cellules gliales ou les macrophages - à l'accumulation extracellulaire de glutamate (Kigerl et al., 2012; Napper et al., 1999).

L'excitotoxicité en elle-même est causée par la sur-stimulation des récepteurs glutamatergiques. Ce phénomène induit de fortes modifications des concentrations ioniques intracellulaires, et s'accompagne d'un influx de Ca^{2+} , entraînant l'activation de mécanismes cellulaires létaux. On a longtemps cru que l'excitotoxicité due au glutamate – dans le cas des neurones corticaux par exemple - était essentiellement causée par l'activation des récepteurs NMDA (Choi, 1998; Choi et al., 1987). Jusqu'à ce que l'utilisation d'inhibiteurs de type NBQX/CNQX spécifiques des récepteurs AMPA/kainate prouve son utilité, comme dans un modèle de mort neuronale induite par LPS/cystine (Kigerl et al., 2012). Les récepteurs AMPA sont désormais aussi reconnus pour avoir un effet excitotoxique lorsqu'ils sont sur-stimulés (Kiagiadaki et al., 2010).

Il est important de noter que si la majorité des études portant sur l'excitotoxicité met en jeu les NMDA-R, c'est parce que jusqu'à récemment les AMPA-R étaient considérés comme imperméables au Ca^{2+} - et pas parce que les AMPA-R jouent un rôle mineur dans ce phénomène. Ce serait d'ailleurs plutôt l'inverse, puisque certaines études en lien avec l'ischémie cérébrale révèlent un meilleur effet neuro-protecteur pour les antagonistes aux AMPA-R.

Le mécanisme impliqué dans l'excitotoxicité induite par le glutamate semble être la production d'espèces réactives oxygénées et azotées induite par l'augmentation de la concentration en ions Ca^{2+} (Dugan et al., 1995; Schinder et al., 1996), ce qui sera détaillé dans le prochain paragraphe.

3.2.1.2.1.2) Les acteurs moléculaires

La sur-stimulation des récepteurs glutamatergiques s'accompagne d'un fort influx de Ca^{2+} , qui conduit à une surcharge intracellulaire. Cette surcharge va permettre l'activation d'une série d'enzymes Ca^{2+} -dépendantes, augmentant la production d'espèces réactives oxygénées et azotées, et activant la cascade de réactions conduisant à la mort cellulaire.

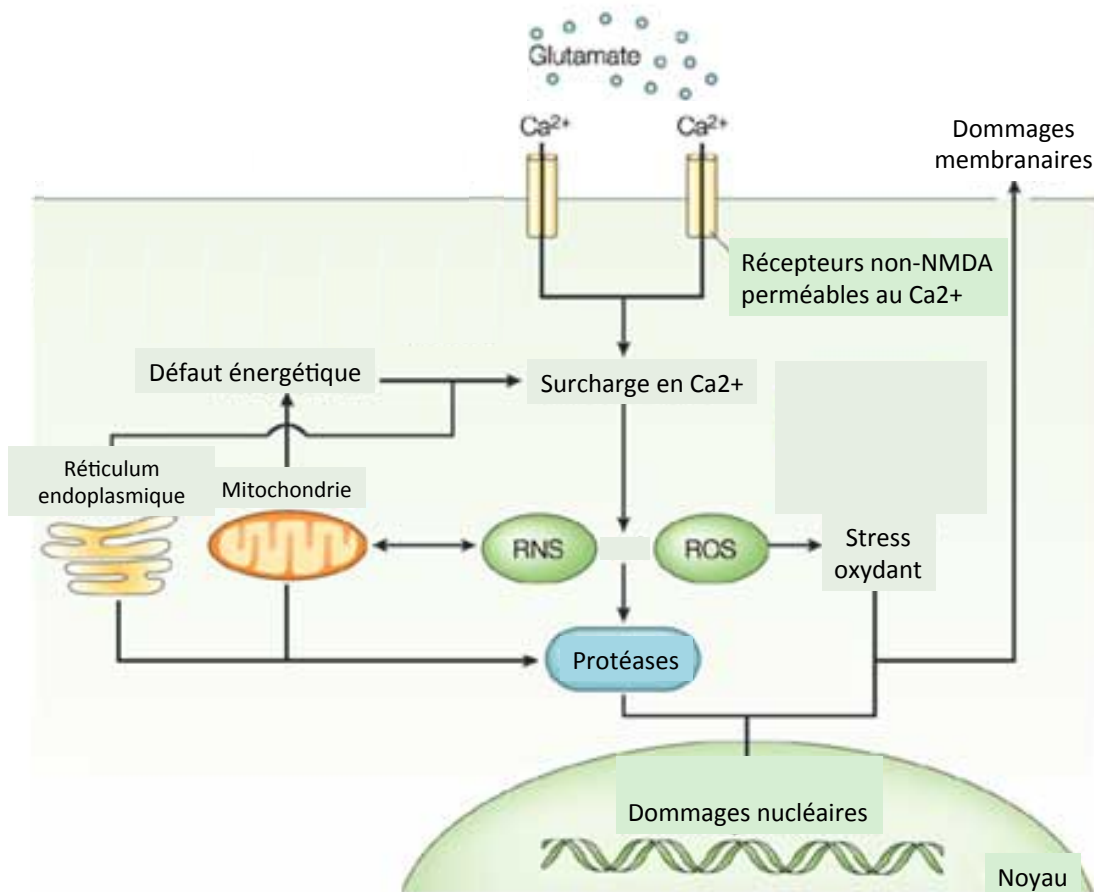


Figure 23 : Schéma représentant les principales voies de signalisation impliquées dans l'excitotoxicité.

(D'après Lo et al, 2003, Nature Review Neuroscience)

Dans le cas de l'excitotoxicité du glutamate, les deux événements clés sont l'influx de Ca²⁺, et l'effondrement du potentiel transmembranaire mitochondrial. Ainsi, l'excitotoxicité du glutamate est associée à une perturbation de l'homéostasie du Ca²⁺, induisant la production de ROS et de RNS, et la perte de fonction mitochondriale (Figure 23).

ROS : Les neurones, qui ont des compétences extrêmement limitées en matière de défense anti-oxydante, sont particulièrement vulnérables à la toxicité due aux radicaux libres ROS (Wang and Michaelis, 2010). En temps normal, les ROS contribuent à la signalisation cellulaire via différents mécanismes, comme la modulation de l'activité enzymatique, ou l'activation de facteurs de transcription (Dröge, 2002). Mais des taux élevés de ROS entraînent l'activation de processus pro-apoptotiques.

Chez les neurones, très gourmands en énergie, une mitochondrie dysfonctionnelle est une source importante de radicaux libres. Ainsi, un problème au niveau de la chaîne de respiration mitochondriale peut contribuer à la mort neuronale via apoptose ou

nécrose. Une autre source neuronale majeure de ROS est la NADPH oxidase, qui favorise la production de superoxyde (Brennan et al., 2009).

RNS : L'influx de Ca^{2+} a aussi pour propriété d'activer l'enzyme nNOS, favorisant la production du messenger gazeux NO (Bredt et al., 1991). L'oxyde nitrique joue un rôle important dans l'excitotoxicité, en interagissant avec l'anion superoxyde pour former la péroxynitrite, hautement toxique (Beckman et al., 1990), qui va ensuite interférer avec la respiration mitochondriale.

Réticulum endoplasmique : Certaines études suggèrent que la production de NO associée à une surcharge en Ca^{2+} entraînerait la libération du Ca^{2+} piégé dans le réticulum, induisant ainsi un stress (Uehara et al., 2006).

Protéases : Les mécanismes apoptotiques induits par l'excitotoxicité requièrent l'activation de protéases telles que les calpaïnes et les caspases. Les calpaïnes, en plus de moduler de nombreux processus physiologiques (Robles et al., 2003), peuvent aussi jouer le rôle de médiateurs dans la mort cellulaire, en activant des voies apoptotiques indépendantes des caspases (Neumar et al., 2003). Les caspases interviennent dans une cascade de mécanismes initiée par la libération du cytochrome c (Danial and Korsmeyer, 2004), et qui s'achève par l'activation de la caspase-3 (Eldadah and Faden, 2000), induisant l'apoptose neuronale.

Cette liste de mécanismes n'est pas exhaustive, mais donne une assez bonne vision de l'ensemble des processus impliqués dans l'apoptose neuronale suite à un événement excitotoxique.

3.2.1.2.1.3) Pathologies liées à l'excitotoxicité

Le rôle de l'excitotoxicité dans ces maladies neuro-dégénératives est aujourd'hui reconnu, et requiert d'autant plus d'attention qu'elles affectent un nombre croissant d'individus. La chorée de Huntington par exemple est un trouble neuro-dégénératif héréditaire qui détériore les fonctions cognitives, les fonctions motrices et l'humeur. Elle affecte sévèrement les projections GABAergiques des neurones épineux moyens situés dans le néostriatum (Vonsattel and DiFiglia, 1998). L'hypothèse excitotoxique a été retenue par certains chercheurs pour expliquer la sensibilité exacerbée des neurones du striatum dans le cadre de cette pathologie, en impliquant les récepteurs glutamatergiques ionotropiques (Coyle and Schwarcz, 1976; Zhang et al., 2008). Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer - un trouble neuro-dégénératif associé à une perte progressive de la mémoire et des fonctions cognitives - ce sont les dépôts de plaques $A\beta$ qui semblent induire les symptômes observés. Ces dépôts initieraient les cascades neurotoxiques entraînant l'excitotoxicité, l'inflammation et la mort neuronale (Selkoe and Hardy, 2016). Concernant la maladie de Parkinson - désordre neurologique causé

par la perte des neurones dopaminergiques – les causes de la maladie sont encore explorées. Le concept d'excitotoxicité serait aussi mis en cause par certaines études (Helton et al., 2008).

La rétine, qui appartient au système nerveux central, est elle aussi soumise au phénomène d'excitotoxicité dans le cadre de certaines pathologies oculaires, comme l'occlusion veineuse, le glaucome, ou la rétinopathie diabétique. Concernant l'ischémie – un ensemble de conditions pathologiques qui entraîne une diminution du flux sanguin, créant un défaut d'oxygène et de glucose - de nombreuses modifications morphologiques et fonctionnelles apparaissent au cours du temps. On constate une diminution de la capture de glutamate via les transporteurs EAATs (Barnett et al., 2001), qui s'accompagne d'une augmentation de la concentration extracellulaire en glutamate, comme cela a pu être mesuré dans l'humeur aqueuse (Wakabayashi et al., 2006). Cette perte de fonction pourrait être due à un ensemble de perturbations métaboliques aiguës (Bull and Barnett, 2002; Conradt and Stoffel, 1997).

Le glaucome caractérisé par une apoptose progressive et rapide des cellules ganglionnaires rétiniennes. Le métabolisme du glutamate est mis en cause dans cette maladie : certaines études rapportent une diminution de l'expression des EAATs dans des modèles de glaucome chez le rongeur (Schuettauf et al., 2007). De même, certains auteurs rapportent une série de perturbations métaboliques au sein de la cellule de Müller, avec typiquement une diminution de l'expression et de l'activité de la glutamine synthétase (Moreno et al., 2005). Enfin, l'article de Ju et al montre une association entre l'augmentation de la pression intra-oculaire et l'occurrence de dommages mitochondriaux dans un modèle murin (Ju et al., 2008).

Dans le cadre de la rétinopathie diabétique – une complication due au diabète – des niveaux élevés de glutamate et de stress oxydant entre autres semblent jouer un rôle essentiel dans la pathogénèse de cette maladie. Les mêmes mécanismes que précédemment semblent être impliqués, avec une petite particularité : alors que la fonction des transporteurs glutamatergiques est bien diminuée (Li and Puro, 2002), certaines études rapporteraient une augmentation de l'activité de la glutamine synthétase (Silva et al., 2013) – apparemment insuffisante pour composer efficacement l'accumulation de glutamate. Il est intéressant de noter que ce dernier article pourrait montrer - sans le nommer - un rôle joué par l'échangeur cystine/glutamate.

Du point de vue thérapeutique, et afin d'éviter une surcharge métabolique intracellulaire en Ca^{2+} due à l'excitotoxicité, il a été envisagé d'inhiber les récepteurs glutamatergiques à l'aide d'antagonistes spécifiques. Cependant, il est désormais évident que le blocage des récepteurs au glutamate interfère avec le fonctionnement du cerveau, et s'accompagne d'effets neurologiques délétères, comme montré dans plusieurs essais cliniques (Lees, 1998). Il paraît donc approprié d'envisager d'autres pistes thérapeutiques.

3.2.1.2.2) Oxytose et système x_c^-

3.2.1.2.2.1) Stress oxydant

Nous avons pu le voir précédemment, le stress oxydant joue un rôle majeur dans la pathogénèse de l'atrophie géographique, notamment vis-à-vis de l'EPR, mais aussi des neurones. On peut dissocier deux composantes du stress oxydatif : les espèces réactives d'une part, et la voie du monoxyde d'azote d'autre part.

L'ensemble des espèces oxydatives oxygénées et azotées forme un autre groupe de médiateurs potentiellement neurotoxiques. Les espèces réactives de l'oxygène sont plus communément appelées ROS, acronyme dérivé de leur appellation anglaise « reactive oxygen species ». Cette famille comprend plusieurs composés chimiques hautement instables qui participent en situation physiologique à certaines chaînes de signalisation (Nimnual et al., 2003). Parmi ces composés, on retrouve l'ion superoxyde, les radicaux hydroxyle, et le peroxyde d'hydrogène (Hensley et al., 2000). Les cellules possèdent un système de défense antioxydant efficace et des mécanismes de réparation adaptés, permettant de lutter efficacement contre les composés instables de l'oxygène (Hunter et al., 1985) mais qui peuvent être débordés dans un cadre inflammatoire.

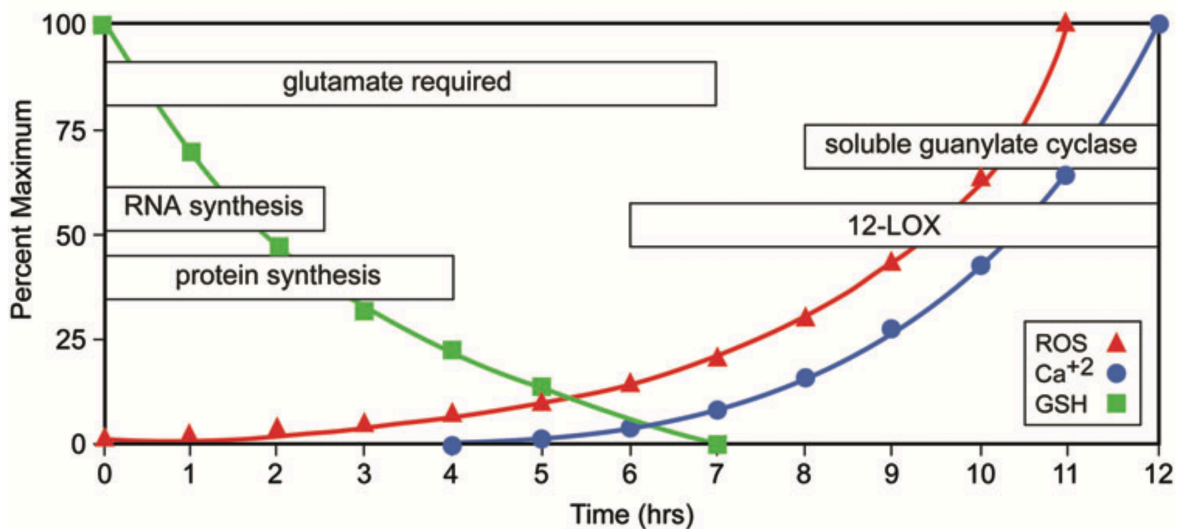


Figure 24 : Toxicité oxydative du glutamate, la mort neuronale induite par l'inhibition du système x_c^- .

(D'après Lewerenz et al, 2011, Antioxidants and Redox Signalling)

L'autre type de médiateur inflammatoire appartenant aux espèces réactives est le messenger gazeux NO, ou monoxyde d'azote, produit par l'enzyme nitric oxide synthase (NOS), dont il existe trois isoformes. La forme neuronale (nNOS) et la forme épithéliale (eNOS) sont constitutivement exprimées par les neurones et les cellules endothéliales respectivement : leur activité est régulée de manière Ca^{2+} -dépendante. La forme

inductible iNOS n'est pas, comme son nom l'indique, exprimée constitutivement : son expression est induite dans les macrophages, les microglies ou les astrocytes en réponse à un stimulus inflammatoire du type endotoxine (LPS) ou cytokine (Stuehr and Marletta, 1985). Le messenger gazeux NO est capable d'induire l'apoptose neuronale, et plus particulièrement lorsque les neurones sont privés de facteurs neurotrophiques (Estevez et al., 1998). Certaines études suggèrent que NO exerce un effet néfaste sur la survie des neurones en inhibant la respiration mitochondriale, conduisant à une défaillance énergétique, puis à une augmentation des concentrations intracellulaires en Na⁺ et en Ca²⁺, induisant finalement la mort neuronale (Kapoor et al., 2003).

3.2.1.2.2.2) Métabolisme du glutathion

Comme nous l'avons vu précédemment, le glutathion est un petit tripeptide GSH, et est l'un des antioxydants biologiques les plus puissants à disposition des cellules. Le glutathion joue le rôle d'agent réducteur pour une grande variété de composés chimiques : disulfides, peroxydes, composés nucléophiles, permettant ainsi d'éliminer les réactifs oxydants comme le peroxyde d'hydrogène ou les radicaux libres.

La première étape dans la synthèse de GSH est la génération de γ -glutamylcystéine, catalysée par la glutamate cystéine ligase (GCL) (Misra and Griffith, 1998). La GSH synthétase catalyse ensuite la synthèse de glutathion à partir de γ -glutamylcystéine et de glycine. Le glutathion peut ensuite être transporté en dehors de la cellule, et va permettre de réduire différents types de ROS via des réactions catalysées par la glutathion peroxydase GPx. Durant cette réaction, le GSH est oxydé en GSSG, puis est recyclé par la GSH réductase, ou est ensuite exporté de la cellule.

3.2.1.2.2.3) Oxytose

Le transport de glutamate via le système x_c⁻ dépend en grande partie du gradient transmembranaire de glutamate. Il peut donc être inhibé par le glutamate extracellulaire, seul antagoniste physiologique connu à ce jour.

En théorie, les transporteurs EAATs ont la capacité fonctionnelle de réduire la concentration extracellulaire de glutamate à 2 nM (Zerangue and Kavanaugh, 1996). Cependant, même si dans le cerveau la majorité du glutamate se trouve en intracellulaire, la concentration extracellulaire mesurée par microdialyse est d'environ 2-9 μ M (Baker et al., 2003). Cette différence résulte de l'export extrasynaptique de glutamate dû à l'activité du système x_c⁻. Le système x_c⁻ est le médiateur de la capture de cystine. La cystine une fois capturée est rapidement réduite en cystéine, la facteur limitant régulant la production du glutathion (Cooper and Kristal, 1997).

En 1989, Murphy et al ont montré que le glutamate induisait la mort cellulaire de manière Ca^{2+} -dépendante, en inhibant la capture de cystine et induisant ainsi une déplétion en GSH, et une augmentation du stress oxydant (Murphy et al., 1989a). L'inhibition de l'import de cystine via le système x_c^- entraîne donc une augmentation du stress oxydant, et éventuellement la mort cellulaire. Ce mécanisme est appelé « toxicité oxydative du glutamate », ou oxytose – oxytosis en anglais. Il est important de noter que le phénomène d'oxytose est fonctionnellement différent de l'excitotoxicité à proprement parler.

Mécanisme : La série d'évènements qui conduit à la mort cellulaire par oxytose a été assez bien caractérisée. Comme nous l'avons vu, de fortes concentrations extracellulaires en glutamate inhibent le fonctionnement du système x_c^- , induisant un défaut de la capture en cystine, ralentissant la synthèse de GSH, jusqu'à sa disparition (Lewerenz et al., 2006b). Environ 6 heures après le traitement au glutamate, la concentration en GSH chute en dessous de 20%, et les radicaux libres produits par l'activité mitochondriale du complexe I s'accumulent exponentiellement (Tan et al., 1998a). L'importance du rôle de la mitochondrie dans la production de ROS (Neitemeier et al., 2016) est soutenue par le fait l'agent découplant du carbonyl cyanide 4-(trifluorométhoxy) phénylhydrazone – plus couramment appelé FCCP - permet une protection relativement efficace des neurone contre l'oxytose (Tan et al., 1998a). L'enzyme 12/15-lipoxygénase entre alors en jeu, probablement suite à l'inhibition de la GSH peroxydase 4 (GPx4) (Seiler et al., 2008), générant les acides 12- et 15-hydroxyeicosatétraoïques (Li et al., 1997a). Ces facteurs activent les guanylates cyclases, qui induisent une augmentation de la concentration intracellulaire en cGMP, et un fort influx de Ca^{2+} s'en suit (Li et al., 1997b). 10 à 12h après l'induction de l'oxytose, la concentration en ROS est maximale, et induit l'apoptose (Landshamer et al., 2008) (Figure 24).

Différences avec l'apoptose classique : La nomenclature actuelle différencie trois types de morts cellulaires : l'apoptose classique ou type I, l'autophagie ou type II, et la nécrose programmée ou type III. L'oxytose partage des caractéristiques avec le type I et le type III (Higgins et al., 2009). Certains résultats suggèrent que dans le cas de l'oxytose, l'apoptose et la nécrose auraient lieu en même temps (Fukui et al., 2009). Globalement, l'oxytose présente quelques particularités, comme l'absence de libération du cytochrome c, et une fragmentation tardive de l'ADN (Tan et al., 1998b).

Le phénomène d'oxytose a pu être étudié et observé à partir de neurones en culture : en effet, dans des culture primaires de neurones immatures, les récepteurs au glutamate ne sont pas exprimés, ce qui prévient l'effet excitotoxique du glutamate extracellulaire en forte concentration. En revanche, il est très intéressant de noter que dans des cultures primaires de neurones maintenus assez longtemps pour que les récepteurs ionotropiques soient exprimés, les cellules sont sensibles à l'excitotoxicité, mais

succombent aussi à l'oxytose induite par le glutamate : les deux phénomènes ne sont donc pas incompatibles (Schubert and Piasecki, 2001).

L'échangeur cystine/glutamate est un outil complexe à manipuler par nature, de par ses effets ambivalents. La surexpression du système x_c^- permet la capture de cystine et la production d'antioxydants, mais occasionne parallèlement une libération excessive de glutamate qui peut être toxique pour les neurones environnants. Le fait que des cellules neuronales immatures en culture incubées avec de hauts niveaux de glutamate meurent à cause du stress oxydant (Murphy et al., 1989a) montre bien qu'en situation pathologique, un déséquilibre entre la libération de glutamate via le système x_c^- et sa recapture par les EAATs pourrait conditionner l'augmentation de la concentration de glutamate extracellulaire jusqu'à des niveaux toxiques.

Ce point mérite une attention particulière dans un contexte pathologique associé à une expression inadéquate des transporteurs au glutamate EAATs, censés théoriquement contrebalancer la libération de glutamate par le système x_c^- . Ce type de déséquilibre a été mis en évidence dans le contexte du gliome (Savaskan et al., 2008), où la surexpression de x_c^- favorise la survie des cellules cancéreuses (Takano et al., 2001) qui produisent une importante quantité de radicaux libres, conséquence logique de leur reconversion métabolique – on parle d'effet Warburg. La libération de glutamate entraîne la neuro-dégénérescence des tissus environnants, favorisant l'apparition de déficits neurologiques chez les patients : heureusement, ces effets morbides peuvent être atténués grâce à l'inhibition du système x_c^- (Savaskan et al., 2008).

3.2.1.3) La production d'IL-1 β induit indirectement la mort neuronale

De précédents rapports font état d'une potentialisation *in vitro* par IL-1 β et IL-6 de l'effet excitotoxique du glutamate sur les neurones (Qiu et al., 1998). L'IL-1 β peut être toxique pour les neurones du cerveau (Holmin and Mathiesen, 2000). En effet, l'IL-1 β est mise en cause dans l'apoptose neuronale déclenchée par l'ischémie cérébrale. Plus particulièrement, l'IL-1 β n'aurait pas d'effet toxique direct sur les neurones : ce sont les cellules gliales qui seraient les médiatrices de cette toxicité. Ce type d'interactions a particulièrement été mis en évidence via les études conduites sur le système x_c^- .

A partir de l'observation que les souris déficientes en IL-1R1 – le récepteur à l'IL-1 β – présentaient moins de pertes neuronales dans un modèle d'ischémie cérébrale, l'équipe de Sandra Hewett a montré le rôle central joué par IL-1 β dans la potentialisation de l'apoptose neuronale, via une sur-activation du système x_c^- des cellules astrocytaires (Fogal et al., 2007). IL-1 β régule l'expression et l'activité du système x_c^- dans les astrocytes en culture. Bien que x_c^- soit aussi exprimé par les neurones et les microglies, il apparaît qu'IL-1 β n'induit de modifications de son expression que dans les cellules gliales, induisant ainsi une libération excessive de glutamate, qui serait le médiateur de la toxicité neuronale causée par IL-1 β dans des conditions hypoxiques (Jackman et al., 2010a). De plus, exposer des co-cultures de neurones/astrocytes en conditions

hypoglycémiques a une dose d'IL-1 β permet aussi de potentialiser la mort neuronale (Jackman et al., 2012a).

Ce type de régulation induite par l'IL-1 β peut paraître contre-intuitive, puisqu'elle entraîne la mort neuronale. Mais il est intéressant de noter que la surexpression du système x_c^- permet malgré tout de favoriser la survie des astrocytes (He et al., 2015) : ainsi, nous serions une fois encore face à un mécanisme théoriquement bénéfique, mais qui peut s'avérer toxique en conditions pathologiques extrêmes – comme l'hypoxie ou l'hypoglycémie. Typiquement, dans la mesure où IL-1 β peut induire une baisse de la capture gliale de glutamate en conditions hypoxiques (Chen et al., 2014), on peut tout à fait imaginer une configuration favorisant la survie des cellules gliales, mais impactant négativement celle des neurones. De manière globale, il a d'ailleurs été montré plusieurs fois que la clairance du glutamate est inhibée en présence de médiateurs pro-inflammatoires, comme le TNF- α ou l'IL-1 β (Chao et al., 1995; Fine et al., 1996; Takahashi et al., 2003).

Enfin, un article, publié en 2016 par Shi et al, a mis en évidence un mécanisme déclenché par l'IL-1 β , impactant l'expression du système x_c^- . Les auteurs ont montré que l'IL-1 β induit une surexpression de l'ARNm codant la sous-unité xCT du système x_c^- dans des astrocytes en culture. Le mécanisme mis en évidence fait intervenir l'élément trans-régulateur HuR, qui en présence d'IL-1 β est transloqué du noyau au cytoplasme, se lie à l'extrémité 3'-UTR de xCT, et en stabilise l'ARNm, permettant ainsi d'augmenter sa demi-vie. Cet effet est accompagné par l'augmentation de la synthèse protéique et l'activité du système x_c^- (Shi et al., 2016).

L'IL-1 β est donc connue pour jouer le rôle d'un médiateur toxique dans le contexte de l'ischémie cérébrale, mais étrangement, certaines études lui confèrent un rôle neuro-protecteur dans la rétine en atténuant l'effet neurotoxique du glutamate (Namekata et al., 2009), ou en prévenant la dégénérescence des photorécepteurs induite par la lumière (LaVail et al., 1992; Whiteley et al., 2001). Cependant, les auteurs de ces études ont réalisé chez les animaux étudiés l'injection intra-vitréenne d'une dose d'IL-1 β équivalente à une dizaine de microgrammes par œil. On sait que les dosages protéiques effectués par ELISA permettent de doser l'IL-1 β à une cinquantaine de picogrammes par œil dans des modèles d'inflammation sous-rétinienne (Lavalette et al., 2011). On peut donc penser à un effet dose-réponse d'IL-1 β , qui serait neuroprotecteur à forte concentration, et neurotoxique à doses plus physiologiques.

Dans l'ensemble, IL-1 β favorise les dommages neuronaux via un mécanisme glutamate-dépendant, dans un contexte où l'énergie fait défaut – c'est-à-dire avec un défaut de glucose ou d'oxygène (Fogal et al., 2007; Jackman et al., 2010b, 2012a). IL-1 β est aussi capable de protéger les astrocytes contre le stress oxydant, en augmentant la biosynthèse de GSH (He et al., 2015). Ces résultats montrent que la capacité de l'IL-1 β à avoir un effet bénéfique ou néfaste est très contexte-dépendant.

3.2.2) Les communications cellulaires rétiniennes

Comme nous l'avons vu, on retrouve trois types de cellules gliales dans la rétine des mammifères : les astrocytes, les cellules gliales de Müller, et les microglies. Ces cellules gliales fournissent un support structurel et métabolique, en phagocytant les débris neuronaux, en produisant des neurotransmetteurs ou des facteurs trophiques, et en régulant les équilibres aqueux et ionique. Les astrocytes, majoritairement localisés dans la couche la plus interne de la rétine, participent à la formation de la barrière hémato-rétinienne en étendant leurs prolongements cytoplasmiques autour des vaisseaux. Les microglies peuvent être stimulées et remplir la fonction de macrophages, mais interagissent aussi bien avec les neurones environnants via la production de facteurs de croissance.

Il serait ambitieux de retranscrire ici l'ensemble des interactions neuro-gliales qui ont lieu au sein de la rétine, c'est pourquoi nous nous focaliserons sur celles qui impactent la survie neuronale, et plus particulièrement les photorécepteurs lorsque cela a été étudié.

3.2.2.1) Interactions neuro-gliales rétiniennes

3.2.2.1.1) Homéostasie du glutamate

Dans la rétine, les cellules de Müller sont responsables de la capture de l'excès de glutamate libéré au niveau des synapses lors de la neuro-transmission. Cette fonction est absolument essentielle au maintien de l'homéostasie rétinienne, et toute perturbation peut impacter la survie des différentes populations neuronales rétiniennes, ce qui peut être considéré comme une forme d'interaction neuro-gliale. Ces mécanismes de régulation ont été présentés au chapitre « 3.2.1.1.1) Le cycle du glutamate ».

3.2.2.1.2) Les facteurs trophiques

Les facteurs neurotrophiques sont des facteurs de croissance qui favorisent le développement et la survie neuronale. L'utilité de ces facteurs a été étudiée dans de nombreuses pathologies neuro-dégénératives – comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, ou le glaucome – afin de promouvoir la survie neuronale (Allen et al., 2013; Johnson et al., 2011).

Le BDNF (Ou Brain-Derived Neurotrophic Factor) appartient à la famille des neurotrophines, est exprimé par les neurones et promeut la survie neuronale (Barde et al., 1982). BDNF se lie à son récepteur TrkB, et induit l'expression de gènes associés à la survie neuronale, tout en inactivant les gènes pro-apoptotiques (Bonni et al., 1999). Il est intéressant de noter que TrkB est exprimé dans les cellules de Müller, mais n'a pas été détecté au niveau des photorécepteurs (Grishanin et al., 2008). Le traitement des

cellules de Müller avec BDNF entraîne en effet l'expression de FGF-2 et CNTF, induisant des effets neuroprotecteurs dans les photorécepteurs (Harada et al., 2015). FGF-2 permet par exemple de directement stimuler la survie des photorécepteur (Fontaine et al., 1998).

Le CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) exerce en effet un effet neuro-protecteur sur les neurones : la délétion du gène codant pour CNTF induit la dégénérescence neuronale dans des modèles murins (Linker et al., 2002). CNTF est majoritairement exprimé par la cellule gliale de Müller dans la rétine (Kirsch et al., 1997). CNTF a montré son efficacité dans la prévention de l'apoptose des photorécepteurs induite dans plusieurs modèles de dégénérescence rétinienne, y compris la rétinite pigmentaire (Cayouette et al., 1998; Tao et al., 2002).

Le GDNF (Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor) appartient à la superfamille de TGF- β . Dans la rétine, GDNF stimule la survie des photorécepteurs dans la dégénérescence rétinienne (Frasson et al., 1999). GDNF est majoritairement exprimé par les photorécepteurs ou l'EPR, et son récepteur est essentiellement exprimé au niveau de la cellule de Müller (Hauck et al., 2006). La culture de cellules de Müller isolée en présence de GDNF induit l'expression de BDNF (Harada et al., 2003), suggérant que GDNF exerce ses effets neuro-protecteurs vis-à-vis des photorécepteurs de manière indirecte, en stimulant les cellules de Müller. De plus, GDNF entraîne la surexpression du transporteur au glutamate EAAT1/GLAST dans les cellules de Müller (Koeberle and Bähr, 2008), suggérant que son utilisation serait une perspective intéressante pour maintenir le glutamate à des concentrations non-neurotoxiques (Harada et al., 1998).

Le NGF (Ou Nerve Growth Factor) appartient à la famille de neurotrophines, et peut stimuler les récepteurs TrkA et p75^{NTR}. La stimulation de ces récepteurs induit des effets opposés : celle de TrkA est associée à l'induction d'effets neuro-protecteurs, alors que celle de p75^{NTR} est impliquée dans l'apoptose neuronale (Frade et al., 1996; Nykjaer et al., 2004). L'utilisation d'antagonistes du récepteur p75^{NTR} permet d'ailleurs d'atténuer la dégénérescence des photorécepteurs dans des modèles de rétinite pigmentaire (Platón-Corchado et al., 2017).

Ces résultats montrent l'importance des interactions neuro-gliales entre les cellules de Müller et les photorécepteurs dans l'induction de la survie neuronale. La stimulation de la neuroprotection via ces mécanismes pourrait ainsi permettre de ralentir la dégénérescence neuronale observée dans l'atrophie géographique.

3.2.2.2) Interactions entre microglies et cellules de Müller

Les mécanismes qui régulent les interactions entre les microglies et les cellules de Müller n'ont pas été exhaustivement élucidés, mais il semble qu'il existe un dialogue entre ces deux populations cellulaires. Certaines données suggèrent que la disponibilité extracellulaire en ATP pourrait moduler la morphologie et l'activité des cellules microgliales (Li et al., 2012). Les cellules de Müller sont une source majeure d'ATP, et pourraient donc être impliquées dans ce mécanisme. Ainsi, le glutamate extracellulaire peut induire la libération d'ATP par les cellules de Müller via l'ouverture de canaux

pannexines (Iglesias et al., 2009), et il a été montré que l'inhibition des canaux pannexines entraîne une diminution de la mobilité des prolongements cytoplasmiques des microglies (Fontainhas et al., 2011). L'altération du métabolisme de la cellule de Müller pourrait donc affecter le fonctionnement des microglies. De même, les cellules de Müller semblent répondre à l'activation des microglies induite par le LPS, notamment en down-régulant l'expression de leurs transporteurs au glutamate, et en augmentant l'expression de gènes pro-inflammatoires (Wang et al., 2011). Il a de plus été montré que les microglies pouvaient libérer des quantités importantes de glutamate, induisant la diminution du transport de glutamate dans les astrocytes, et contribuant ainsi à l'accumulation plus importante du glutamate extracellulaire (Takaki et al., 2012). Il est intéressant de noter que dans certains modèles, les interactions microglie-cellules de Müller impactent la production de facteurs neurotrophiques, ce qui pourrait moduler la survie neuronale (Harada et al., 2002). Certaines de ces expériences ont été réalisées *in vitro*, il est donc risqué d'étendre leurs conclusions au fonctionnement d'une rétine entière, mais il est intéressant de noter que la signalisation mutuelle entre microglies et cellules de Müller pourrait amplifier les signaux inflammatoires.

OBJECTIFS

La dégénérescence maculaire liée à l'âge, ou DMLA, est la première cause de cécité chez les seniors dans les pays industrialisés (Klein et al., 2004). C'est une pathologie multifactorielle associée à l'âge qui résulte de l'interaction entre des facteurs de risques génétiques et environnementaux, (Yu et al., 2012). La DMLA affecte particulièrement la macula, zone de vision précise riche en cônes située au centre de la rétine. Dans un premier temps, la DMLA au stade précoce asymptomatique - dit « maculopathie liée à l'âge » - est caractérisée par la présence de dépôts lipoprotéiques de type « drusens » au niveau de la macula, et des anomalies pigmentaire de l'épithélium pigmentaire rétinien sous-jacent (Bird et al., 1995). Chez certains patients, ce stade précoce peut évoluer vers un état plus avancé (Klein et al., 2004) dont il existe deux formes cliniques : la DMLA exsudative - ou forme humide - et la géographie atrophique - ou forme sèche (Sarks, 1976). La forme humide est caractérisée par la néo-vascularisation sous-rétinienne qui se développe à partir de la choroïde, et s'accompagne de fuites vasculaires (Sarks, 1976). Dans la forme sèche, une lésion atrophique définie par la perte de l'épithélium pigmentaire (EPR) et la dégénérescence des photorécepteurs (Sarks, 1976) se développe progressivement au niveau de la macula (Sarks et al., 1988). A l'heure actuelle, des injections régulières d'anti-VEGF permettent de ralentir la progression de la DMLA exsudative chez 90% des patients (Rofagha et al., 2013), mais il n'existe encore aucun traitement pour l'atrophie géographique.

A l'état normal, la couche des photorécepteurs et l'espace sous-rétinien sont dépourvus de cellules immunitaires grâce à l'effet immunosuppresseur de l'EPR (Streilein et al., 2002). Mais la forme sèche de la DMLA est caractérisée par un contexte inflammatoire chronique qui s'accompagne d'une forte accumulation de cellules immunitaires dans l'espace sous-rétinien, comprenant entre autres les macrophages et les microglies (Combadière et al., 2007). Les travaux précédents de notre équipe ont permis de montrer que dans l'atrophie géographique, des macrophages inflammatoires CCR2+ sont invariablement présents au niveau des lésions atrophiques, ainsi que dans la zone de transition (ZT) (Levy et al., 2015a; Sennlaub et al., 2013). La zone atrophique (ZA) est caractérisée par une absence totale d'EPR et par une très forte dégénérescence des photorécepteurs. Elle est bordée par une zone de transition, au niveau de laquelle l'EPR est toujours présent mais où l'on peut observer une forte perte des bâtonnets et un raccourcissement important des segments externes des cônes (Bird et al., 2014). Il est clairement établi qu'un dysfonctionnement de l'EPR - qui en conditions physiologiques assure de nombreuses fonctions favorisant la survie des photorécepteurs - conduit à l'apparition de modifications histo-pathologiques entraînant la dégénérescence des photorécepteurs (Mitamura et al., 2013). Notre groupe a montré l'impact de l'accumulation sous-rétinienne de phagocytes mononucléés re-larguant une grande quantité de médiateurs inflammatoires sur la survie des photorécepteurs (Hu et al., 2015; Sennlaub et al., 2013) et sur la physiologie de l'EPR (Mathis et al., 2017). Le premier objectif de ma thèse a consisté à déterminer si les phagocytes mononucléés sont capables d'induire la perte des segments des cônes comme on l'observe dans l'atrophie

géographique, et d'en déterminer le médiateur. Cette thématique est développée dans le premier article « Les phagocytes mononucléés sous-rétiniens induisent la perte des segments des cônes via IL-1 β ».

Nous avons ensuite cherché à comprendre comment l'IL-1 β induit l'apoptose des bâtonnets. En effet, des données publiées précédemment par notre équipe indiquent que les macrophages cultivés en présence d'explants rétiniens induisent l'apoptose des bâtonnets (Sennlaub et al., 2013), et que cette dégénérescence est dépendante de la production d'IL-1 β (Hu et al., 2015). Dans la rétine, les photorécepteurs n'expriment pas ou très peu le récepteur à l'IL-1 β , IL-1R1 (Scuderi et al., 2015), contrairement aux cellules gliales de Müller (Liu et al., 2012; Namekata et al., 2008). La deuxième étape de ma thèse a donc consisté à caractériser les mécanismes à priori indirect par lesquels IL-1 β peut altérer la survie des bâtonnets, et tenter d'identifier un agent thérapeutique pouvant prévenir leur apoptose. Plusieurs études ont montré qu'IL-1 β n'exerce pas d'effet toxique direct sur les neurones, mais potentialise leur dégénérescence via son action sur les cellules gliales (Fogal et al., 2007) en induisant une augmentation de la libération de glutamate (Jackman et al., 2012b). Dans la rétine, IL-1 β induit une perturbation de l'homéostasie du glutamate en diminuant sa recapture par les cellules gliales de Müller (Chen et al., 2014). IL-1 β induit aussi l'augmentation de la transcription et de l'activité du transporteur cystine/glutamate x_c^- dans les cellules gliales, favorisant ainsi la sécrétion de glutamate (Fogal et al., 2007). Ces données suggèrent qu'IL-1 β pourrait affecter la survie des bâtonnets en perturbant l'homéostasie rétinienne du glutamate. Cette thématique est développée dans le deuxième article intitulé « La production d'IL-1 β par les phagocytes mononucléés sous-rétiniens induit la dégénérescence des bâtonnets en dérégulant l'homéostasie rétinienne du glutamate ».

RESULTATS

Article 1 : Les phagocytes mononucléés sous-rétiniens induisent la perte des segments des cônes via IL-1 beta :

1) Situation du sujet :

L'atrophie géographique, l'une des formes tardives de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), est caractérisée par une lésion atrophique qui s'étend progressivement. Cette lésion est définie par la perte de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), et la dégénérescence de la couche des photorécepteurs (Sarks, 1976). Au niveau de la zone de transition (ZT) située en périphérie de la zone atrophique (ZA), le nombre de bâtonnets chute brutalement (Bird et al., 2014; Curcio, 2001) ; le nombre de cônes ne diminue pas mais ceux-ci ont perdu leurs segments externes.

Nous avons montré précédemment que dans l'atrophie géographique, les phagocytes mononucléés – comprenant les monocytes, les macrophages et les microglies - sous-rétiniens s'accumulent au niveau de la zone atrophique et la zone de transition (Combadière et al., 2007; Levy et al., 2015a). Nous avons démontré que les macrophages CCR2+ provenant de la circulation sanguine participent systématiquement à l'infiltration sous-rétinienne dans la ZA et la ZT (Sennlaub et al., 2013). Chez la souris, le recrutement de monocytes circulants joue aussi un rôle majeur dans la dégénérescence des photorécepteurs (Cruz-Guilloty et al., 2013). Nous avons montré que les monocytes murins purifiés à partir de la moelle osseuse induisent *in vivo* et *in vitro* l'apoptose des bâtonnets (Sennlaub et al., 2013), et que cet effet est en partie causé par l'IL-1 β (Hu et al., 2015). Certains résultats suggèrent que les macrophages sous-rétiniens participent aussi à la dégénérescence des segments de cônes dans la rétinite pigmentaire (Gupta et al., 2003).

Nous proposons ici d'établir un lien entre l'accumulation sous-rétinienne de macrophages et l'atrophie des segments de cônes.

2) Résultats :

2.1) La présence de phagocytes mononucléés dans l'espace sous-rétinien est associée avec la perte des segments externes des cônes :

Nous avons analysé par immunohistochimie sur coupe de rétine humaine les populations de cônes et de bâtonnets chez des patients présentant une atrophie géographique, en les comparant à des patients sains. Nos résultats confirment que le nombre de bâtonnets est drastiquement réduit au niveau de la zone de transition, comme dans la zone atrophique ; le nombre de cônes est réduit d'environ 50% seulement au niveau de la zone atrophique. Ce résultat confirme les observations de Bird et al.

Nous avons ensuite réalisé des immuno-marquages sur rétines à plat, afin de révéler l'association entre la présence de phagocytes mononucléés CD14+ et la perte des segments de cônes. Nos résultats confirment la présence de macrophages CD14+ au niveau de la zone de transition. La reconstruction 3D des images acquises au microscope confocal nous a ensuite permis de montrer la perte presque totale des segments externes des cônes, associée à la présence de macrophages CD14+.

2.2) La culture d'explants rétiniens en présence de macrophages permet de reproduire la perte de segments de cônes :

Afin de reproduire *ex vivo* nos observations réalisées chez l'homme, nous avons adapté un modèle d'explants rétiniens utilisé précédemment (Hu et al., 2015), en cultivant des macrophages humains avec des explants rétiniens de primate ou de souris. Nous montrons ici que ce modèle de co-culture permet d'induire l'apoptose des bâtonnets. L'analyse des cônes montre qu'en présence de macrophages, leur nombre ne diminue pas, mais que leur segment externe est très fortement réduit.

2.3) L'IL-1 β induit la perte des segments de cônes *ex vivo* et *in vivo* :

Les macrophages humains étant facilement activables pour la production d'IL-1 β (Netea et al., 2009), nous avons cultivé des explants rétiniens en présence d'IL-1 β . Nous montrons ici que l'IL-1 β induit la perte des segments externes des cônes, et que l'utilisation de l'antagoniste IL-1Ra permet de prévenir la réduction des cônes induite par les macrophages. Ces résultats ont ensuite été confirmés *in vivo* dans un modèle d'inflammation sous-rétinienne induite chez la souris Cx3cr1 $^{-/-}$ par exposition à la lumière. Nous montrons que l'injection intra-vitréenne d'IL-1Ra permet là encore d'inhiber la perte des segments de cônes.

3) Conclusions :

Nos résultats démontrent l'association entre la présence de phagocytes mononucléés sous-rétiniens et la dégénérescence des segments externes de photorécepteurs en cônes. Les macrophages induisent un phénotype similaire *in vitro* et *in vivo*. Les données que nous avons obtenues montrent clairement que les macrophages participent aux mécanismes induisant la dégénérescence de la couche des photorécepteurs dans l'atrophie géographique, et que l'IL-1 β est le médiateur de cette toxicité.



Subretinal mononuclear phagocytes induce cone segment loss via IL-1 β

Chiara M Eandi^{1,2,3,4†}, Hugo Charles Messance^{1,2†}, Sébastien Augustin^{1,2}, Elisa Dominguez^{1,2}, Sophie Lavalette^{1,2}, Valérie Forster^{1,2}, Shulong Justin Hu^{1,2}, Lourdes Siquieros^{1,2}, Cheryl Mae Craft^{5,6,7,8}, José-Alain Sahel^{1,2,9}, Ramin Tadayoni^{1,2,10}, Michel Paques^{1,2,9}, Xavier Guillonau^{1,2‡}, Florian Sennlaub^{1,2**}

¹Sorbonne Universités, UPMC University Paris 06, INSERM, CNRS, Paris, France; ²Institut de la Vision, Paris, France; ³Department of Clinical Science, University of Torino, Torino, Italy; ⁴Eye Clinic, University of Torino, Torino, Italy; ⁵Mary D. Allen Laboratory for Vision Research, Keck School of Medicine of the University of Southern California, Los Angeles, United States; ⁶University of Southern California Eye Institute, Keck School of Medicine of the University of Southern California, Los Angeles, United States; ⁷Department of Ophthalmology and Cell, Keck School of Medicine of the University of Southern California, Los Angeles, United States; ⁸Department of Neurobiology, Keck School of Medicine of the University of Southern California, Los Angeles, United States; ⁹Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts, INSERM-DHOS CIC 503, Paris, France; ¹⁰Department of Ophthalmology, Hôpital Lariboisier, Paris, France

*For correspondence: florian.sennlaub@inserm.fr

†These authors also contributed equally to this work

‡These authors also contributed equally to this work

Competing interests: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 14

Received: 02 April 2016

Accepted: 19 July 2016

Published: 20 July 2016

Reviewing editor: Jeremy Nathans, Johns Hopkins University School of Medicine, United States

© Copyright Eandi et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Abstract Photo-transduction in cone segments (CS) is crucial for high acuity daytime vision. For ill-defined reasons, CS degenerate in retinitis pigmentosa (RP) and in the transitional zone (TZ) of atrophic zones (AZ), which characterize geographic atrophy (GA). Our experiments confirm the loss of cone segments (CS) in the TZ of patients with GA and show their association with subretinal CD14⁺ mononuclear phagocyte (MP) infiltration that is also reported in RP. Using human and mouse MPs in vitro and inflammation-prone *Cx3cr1^{GFP/GFP}* mice in vivo, we demonstrate that MP-derived IL-1 β leads to severe CS degeneration. Our results strongly suggest that subretinal MP accumulation participates in the observed pathological photoreceptor changes in these diseases. Inhibiting subretinal MP accumulation or IL-1 β might protect the CS and help preserve high acuity daytime vision in conditions characterized by subretinal inflammation, such as AMD and RP.

DOI: [10.7554/eLife.16490.001](https://doi.org/10.7554/eLife.16490.001)

Introduction

The macula consists of a small cone-dominated fovea, responsible for high acuity vision, surrounded by a rod-dominated parafovea and peripheral retina. Photo-transduction in cone segments (CS) are crucial for cone function and therefore high acuity and daytime vision. In geographic atrophy (GA), a late form of age-related Macular Degeneration (AMD), an extending atrophic zone (AZ) forms, characterized by the loss of the retinal pigment epithelium (RPE, a monolayer of cells with important functions in photoreceptor homeostasis) and degeneration of the photoreceptor cell layer (Sarks, 1976). The initial lesion in GA often develops parafoveally (Sarks et al., 1988) and slowly expands through the central retina and fovea, which leads to a severe drop in visual acuity. In the AZ, despite the absence of the RPE, residual cones survive, but they lack the cone segments (CS) (Bird et al., 2014). Similar findings are observed in disciform subretinal scars, the end-stage of

exudative AMD (Curcio, 2001). Surprisingly, in a transitional zone (TZ), just peripheral to the RPE-loss in the scar and AZ, the number of rods drops dramatically compared to the retina more distant from the lesion (Bird et al., 2014; Curcio, 2001). In contrast, the number of cones changes little in the TZ, but they lack their CS (Bird et al., 2014; Curcio, 2001). One could assume that the CS loss in the TZ of AMD patients is due to RPE dysfunction, but CS loss is also observed in retinitis pigmentosa (RP) patients with rod-gene mutations and unremarkable RPE (Mitamura et al., 2013).

Mononuclear phagocytes (MP) comprise a family of cells that include classical monocytes (Mo), macrophages (M ϕ), and microglial cells (MC) among others (Chow et al., 2011). We and others have shown that subretinal MPs accumulate in the AZ and on the apical side of the RPE of the TZ in patients with GA (Combadière et al., 2007; Gupta et al., 2003; Lad et al., 2015; Levy et al., 2015). We have recently demonstrated that numerous blood-derived MPs (CCR2-positive) invariably participate in the infiltration of both, the AZ and TZ (Sennlaub et al., 2013). In mice, the recruitment of blood-derived monocytes contributes importantly to autoimmune, photo-oxidative, and genetic photoreceptor degeneration (Rutar et al., 2012; Suzuki et al., 2012; Kohno et al., 2013; Cruz-Guiloty, 2013) and we demonstrated that bone-marrow derived murine monocytes induce rod apoptosis in vivo and in vitro (Sennlaub et al., 2013), which is in part mediated by IL-1 β (Hu et al., 2015). Interestingly, subretinal MPs also accumulate in RP secondarily to primary rod cell death, and have been suggested to induce the unexplained CS degeneration in these patients (Gupta et al., 2003).

We here confirm that the TZ is infiltrated by CD14⁺MPs and that rod photoreceptors and cone segments are lost in the TZ despite the presence of underlying RPE. Using co-cultures of human CD14⁺Mos and mouse bone-marrow derived Mos with retinal explants in vitro and inflammation-prone *Cx3cr1^{GFP/GFP}* mice in vivo, we show that MP derived IL-1 β induces CS degeneration additionally to previously reported rod apoptosis. Taken together, our results suggest that the presence of CD14⁺MPs in the subretinal space, not only observed in the TZ but also in patients with RP, participates in CS degeneration as they produce similar changes in vitro and in vivo.

Results

Cone and rod loss in relation to GA lesions

Bird and colleagues recently analyzed the loss of outer nuclear layer (ONL) nuclei and cone outer segments in GA using histology and electron microscopy (Bird et al., 2014). They reported that rod loss and cone outer segment degeneration occur peripheral to the margin of the RPE defect, in the transitional zone (TZ) (Bird et al., 2014). In this report, we analyzed the rod and cone populations in and around 10 atrophic zones (AZ) of 9 GA donor patients and in 6 control, non GA donor eyes using immunohistochemical techniques on paraffin sections with specific primary antibodies for rhodopsin, L/M-cone opsin, and cone arrestin, which allows identifying rod or cone photoreceptors even if they lost their outer segments. In the central region of control eyes, cone arrestin (green staining) -rhodopsin (red staining) double labeling visualized a 4 to 6 nuclei thick ONL, with cone segments (CS) and dendrites clearly demarcated by the cone arrestin immunological staining (Figure 1A, Hoechst blue staining of nuclei, RPE autofluorescence orange). The rod outer segments (OS) are strongly immunologically positive for rhodopsin staining, while the rod cell bodies stained more faintly, but enough to identify rod cell bodies (Figure 1A inset). The retina distant (>1000 μ m) from the RPE lesion in sections from donor eyes with GA was very similar to the control eyes (Figure 1B), featuring clearly marked cone arrestin⁺ CS (Figure 1B inset). In the TZ, close to the margin of the lesion but where RPE was still present, the ONL was irregular, thinned (around 2 nuclei of ONL), and cone and rod morphology was severely altered with the outer segments missing and the inner segments difficult to distinguish from the cell bodies (Figure 1C). The thinning and loss of segments was invariably found to extend peripherally to the margin of the RPE loss, into the TZ (Figure 1C, the autofluorescent RPE is visible in the left part of the micrograph, the arrow depicts the margin of the RPE with the atrophic zone to the right). The TZ, characterized by a thinned ONL in the presence of underlying RPE, was of variable length (200–800 μ m) in our samples similar to previous reports (Bird et al., 2014). Within the AZ residual cone arrestin⁺ cones, but also rhodopsin⁺ rods were observed in all but one analyzed samples, but their distribution was irregular and all photoreceptors lacked their OS (Figure 1D). L/M-cone opsin immunohistochemistry, which recognizes the opsins of the most abundant red and green cones, confirmed the CS loss in the TZ and AZ

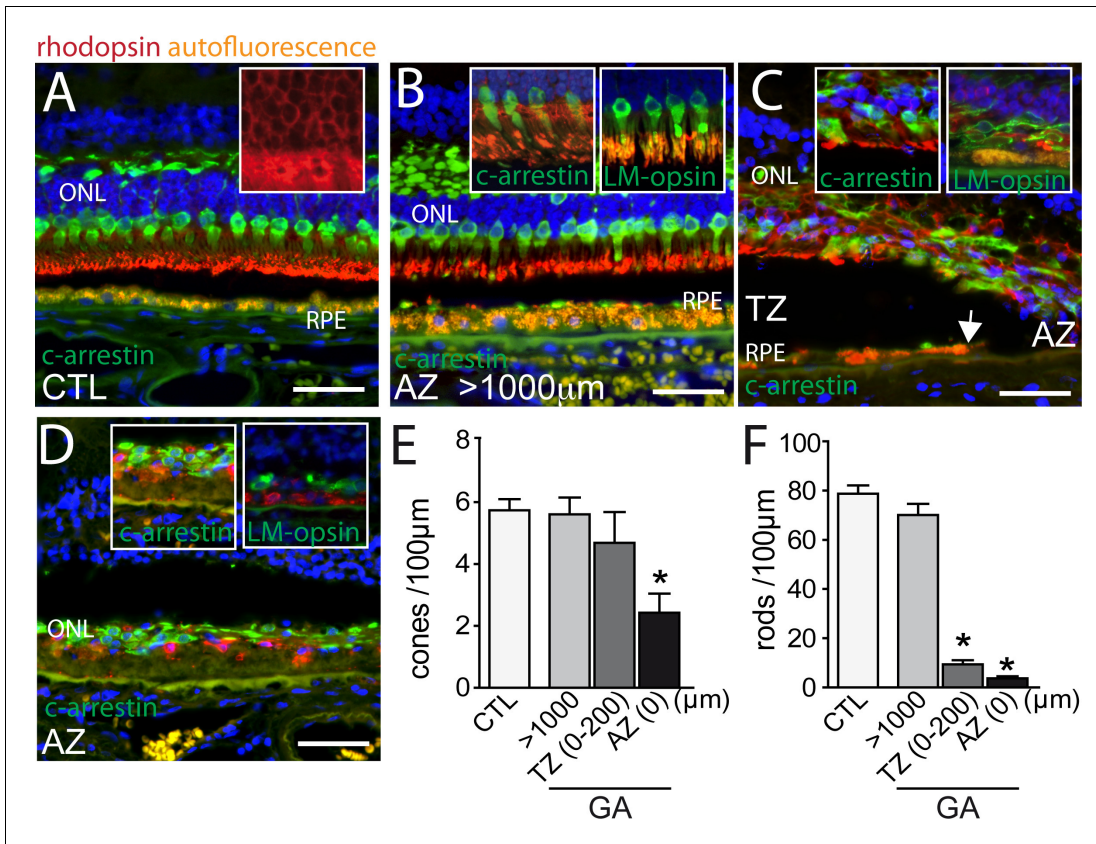


Figure 1. Rhodopsin, cone arrestin, and L/M cone opsin staining on central sections from control and geographic atrophy patients. (A–D) Representative micrographs of immunohistochemical detection of rhodopsin (red), cone arrestin (green, A–D and left insets of B, C and D), or L/M cone opsin (green, right insets of B, C and D) and Hoechst nuclear stain (blue, RPE autofluorescence visible in orange) on central sections of control donors (A) and donors with geographic atrophy (GA, panel B–D) at a distance greater than 1000 µm from the atrophic zone (AZ) (B), at the boundary of the AZ and transitional zone (TZ, panel C; white arrow indicates the margin of the autofluorescent RPE), and within the AZ (D). (E and F) Quantification of the number of arrestin⁺ cone somata (E, one way ANOVA, Dunnett’s post test *p=0,0024) and rhodopsin⁺ rod somata (F, one way ANOVA, Dunnett’s post test *p<0.0001) in control- and GA-donors (10 GA samples from 9 donors and in 6 control samples from 6 donors). ONL: outer nuclear layer; c-arrestin: cone-arrestin; RPE: retinal pigment epithelium; CTL: control; AZ: atrophic zone; TZ: transitional zone; GA: geographic atrophy. Scale bar = 50 µm.
DOI: 10.7554/eLife.16490.002

(Figure 1C,D insets). Next, we quantified cone arrestin⁺ cones (Figure 1E) and rhodopsin⁺ rods (Figure 1F) in the central retina of control eyes and eyes with GA lesions. The cone density at a greater than 1000 µm distance from the RPE-denuded AZ, was similar between control and GA eyes. In the atrophic zone the number of cone somata was significantly reduced to around half the numbers of controls (Figure 1E) and was not significantly different in the TZ (0–200 µm from the AZ, which is the TZ length invariably found in all donor eyes). Rod cell counts, on the other hand, revealed a slight decrease distant from the lesions, but a severe 90% reduction in the TZ compared to controls (Figure 1F). Interestingly, in all but one atrophic zone we also detected rhodopsin⁺ residual rods.

Taken together, our results confirm a severe rod cell loss in the TZ of patients with GA, where the RPE is still morphologically intact, while the number of cone numbers was relatively spared. However, cones of the TZ and residual rods and cones in the AZ had invariably lost their segments.

Subretinal CD14⁺ mononuclear phagocytes associate with cone segment loss in the transitional zone

Using pan- mononuclear phagocyte (MP) markers, we and others have previously shown that the subretinal space (i) above large Drusen (*Lad et al., 2015; Levy et al., 2015; Sennlaub et al., 2013*), (ii) within GA lesions (*Combadière et al., 2007; Gupta et al., 2003; Lad et al., 2015; Sennlaub et al., 2013; Penfold et al., 2001*), and (iii) in the TZ of patients with GA (*Levy et al., 2015; Sennlaub et al., 2013*) are infiltrated with MPs. We demonstrated that blood-born classical CD18⁺CCR2⁺Mos take part in the infiltrate at these three locations (*Sennlaub et al., 2013*). Circulating classical Mos also express high levels of CD14 (*Geissmann et al., 2003*), which is additionally expressed by other members of the MP family (*Gautier et al., 2012*) and is therefore not discriminative for infiltrating Mos versus resident MPs (unlike CCR2). We analyzed the presence of subretinal CD14⁺MPs and cone segment morphology on central RPE/choroid and retinal flat-mounts from 4 age-matched control donor eyes (*Figure 2A–D*) and 5 donor eyes with central GA lesions (*Figure 2E–H*), with particular attention to the TZ. Flat-mount immunohistochemistry facilitates the appreciation of cone outer segments and the detection of the smaller, dispersed MPs that are more difficult to detect on sections. We used CD14 immunohistochemistry to visualize MPs, peanut agglutinin (PNA) that stains inner and outer CS (but not cone cell bodies) (*Blanks and Johnson, 1984*),

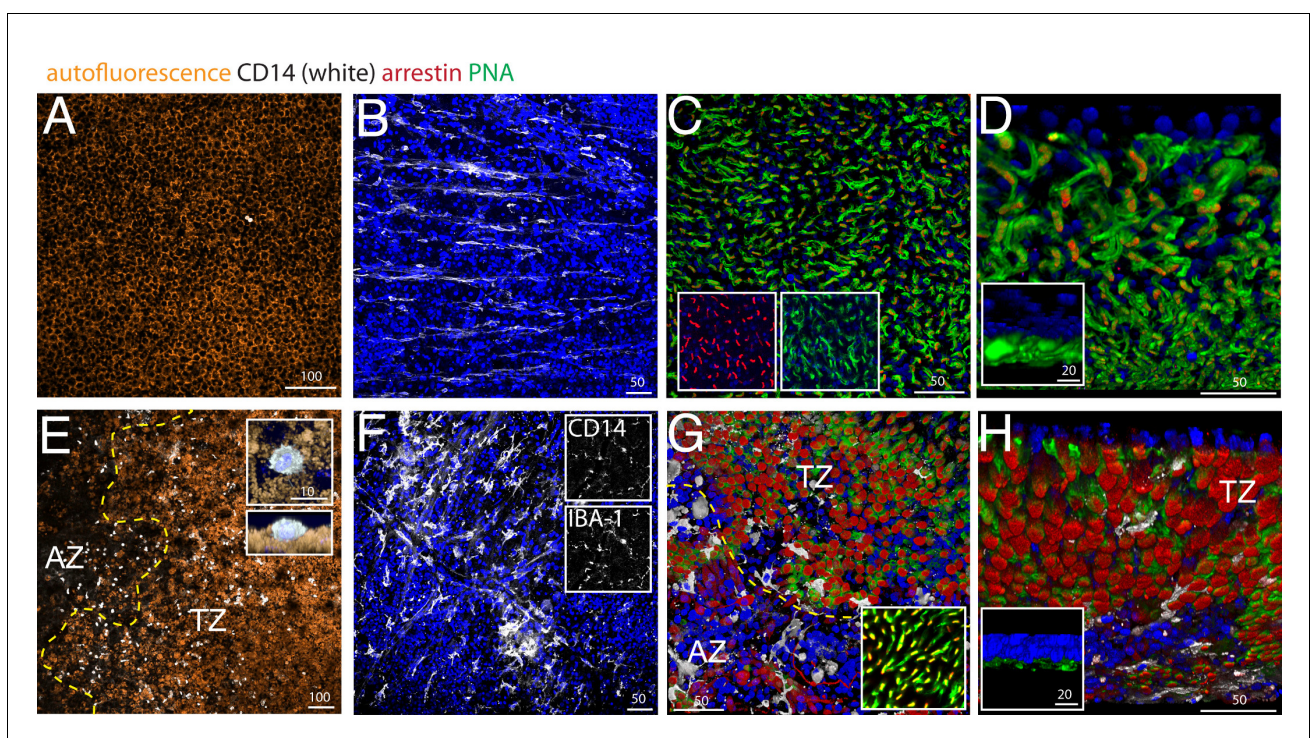


Figure 2. CD14, peanut agglutinin and cone arrestin staining on central flatmount preparations from control and geographic atrophy patients. Representative micrographs of immunohistochemical detection (confocal Z stack projections) of CD14 (white), cone arrestin (red), peanut agglutinin (PNA, green), and Hoechst nuclear stain (blue, RPE autofluorescence visible in orange) of RPE/choroid- (A and E) and retinal- flatmounts (B–D and F–H) of a control donor (A–D) and a donor with geographic atrophy (GA, panel E–H). (E) 3D reconstruction at higher magnification of a CD14⁺ cell on RPE flatmounts in an orthogonal (E, upper inset) and perpendicular (E, lower inset). (F) Representative confocal micrographs of CD14 (F, upper inset) -IBA-1 (F, lower inset) double labeling. (D and H) Oblique and perpendicular (insets) 3D reconstruction views of the outer aspect of the retinal flatmounts. The margin of the atrophic zone (AZ), recognized by the loss of RPE (E) and by the irregular cone distribution and a thinned outer nuclear layer (G) is indicated by the yellow dotted line. (G) PNA/arrestin pattern distant (>1000 μm) from the AZ of a patient with GA (G inset). Experiments on flatmounts from 4 different control and patients with GA gave similar results. AZ : atrophic zone; TZ : transitional zone. Scale bars A and E = 100 μm; B–C and F–G = 50 μm; inset D and H = 20 μm.

DOI: 10.7554/eLife.16490.003

and cone arrestin that stains cones irrespective of the presence of CS (see **Figure 1**). Central (1.5 cm around the fovea/center) retina/RPE/choroid complexes were dissected from the donor eyes and sectioned by radial incisions into 8 triangular pieces that each contain a parafoveal part in the case of control eyes and a central AZ, TZ, and non-atrophic more peripheral part for GA donor eyes. In GA tissues, the retinas of the AZ were carefully peeled from the RPE/choroid, as they adhere to Bruch's membrane in the area of RPE defects. This is not the case in the TZ, where the retina detaches easily from the underlying RPE, comparable to control retinas.

Confocal microscopy of CD14 stained central RPE confirmed that subretinal CD14⁺MPs are only very occasionally observed in healthy age-matched donors (**Figure 2A**, CD14 white staining, RPE orange autofluorescence). Within the AZ of patients with GA where the RPE has disappeared (**Figure 2E** right to the yellow dotted line, AZ), CD14⁺MPs were numerous, but were also always observed on the autofluorescent RPE in the TZ (**Figure 2E** left to the yellow dotted line, TZ), very similar to our published results using an IBA-1 antibody (Levy et al., 2015). A three dimensional reconstruction of an orthogonal and perpendicular close up view of a CD14⁺cell shows its position on the apical side of the CD14-negative RPE (**Figure 2E** insets). The RPE also expresses CD14, but to a much lesser extent compared to MPs (Elner et al., 2003), which might explain why the RPE did not appear CD14-positive in our experimental conditions. A comparative RT-PCR of CD14 in human blood-derived Mos versus human post-mortem RPE cells revealed a ten-fold stronger expression in Mo in our samples (data not shown).

On retinal flatmounts, confocal microscopy of CD14 (white staining) / cone arrestin (red staining) / PNA (green staining) / Hoechst nuclear stain (blue staining) immunohistochemistry of control retina shows the CD14⁺-resting MCs of the ganglion cell layer with their long processes (**Figure 2B**), while CD14⁺MCs of the central inner retina of patients with GA displayed an activated MC phenotype with shortened processes (**Figure 2F**). CD14⁺MCs also stained positive for the marker IBA-1, confirming their MP nature (**Figure 2F** insets). Orthogonal Z stack projections (**Figure 2C**), and oblique (**Figure 2D**) and perpendicular 3D reconstruction views (**Figure 2D** inset) of the outer aspect of the retinal flat-mounts reveal the normal cone arrestin⁺PNA⁺ segments of the central parafoveal retina in the absence of CD14⁺MPs. Retinal flat-mounts of the AZ and adjacent TZ of patients with GA (**Figure 2G** below and above the yellow dotted line, respectively) show CD14⁺MPs that stayed attached to the retina (white staining). In the AZ, recognizable by a severely thinned ONL and a slightly brown color in bright-field microscopy due to RPE-debris sticking to the subretinal aspect of the flat-mount, the PNA staining was much reduced, but cone arrestin⁺ cone cell bodies were visible in reduced numbers and their distribution was irregular (**Figure 2G**). In the adjacent TZ cone arrestin⁺ cone density was relatively spared (**Figure 2G**). However, in both the AZ and TZ the typical cone arrestin⁺PNA⁺ cone segment pattern had disappeared and cone arrestin immunological staining pattern of the remaining cone somata became apparent in the flat-mount, possibly because of greater antibody penetration in the thinned retinal flatmount. At a greater distance to the atrophic zone (>1000 μm), cone arrestin and PNA immunological staining located to cone segments, was indistinguishable to the pattern observed in flat-mounts from healthy donors (**Figure 2G** inset). Oblique (**Figure 2H**) and perpendicular 3D reconstruction views (**Figure 2H** inset) reveal the nearly complete loss of normal PNA⁺ cone segments in the transitional zone that is associated with the presence of CD14⁺MPs.

In summary, these results confirm the loss of cone inner and outer segments adjacent to the atrophic zone where the RPE is present that we observed in sections (**Figure 1**). They illustrate the close physical association of cone segment loss and CD14⁺Mos accumulation in the TZ.

Mononuclear phagocytes induce cone segment loss in retinal explants ex vivo

We have previously shown that wildtype- and in particular Cx3cr1-deficient-mouse bone marrow-derived monocytes (BMM) induce photoreceptor cell apoptosis in a monocyte/ mouse retinal explant co-culture system (Sennlaub et al., 2013). To analyze an eventual effect of human MPs on photoreceptors, we first co-cultured 100 000 human blood-derived CD14⁺Mos (hMo) adhering to polycarbonate filters floating on DMEM with C57BL/6 mouse retinal explants for 18 hr (with the photoreceptors facing the adherent Mos). Apoptosis was analyzed by TUNEL staining of the retinal explants cultured without Mos (**Figure 3A**), or with Mos (**Figure 3B**). TUNEL⁺ nuclei in the photoreceptor cell layer of retinal explants were more numerous in the presence of Mos. Double-

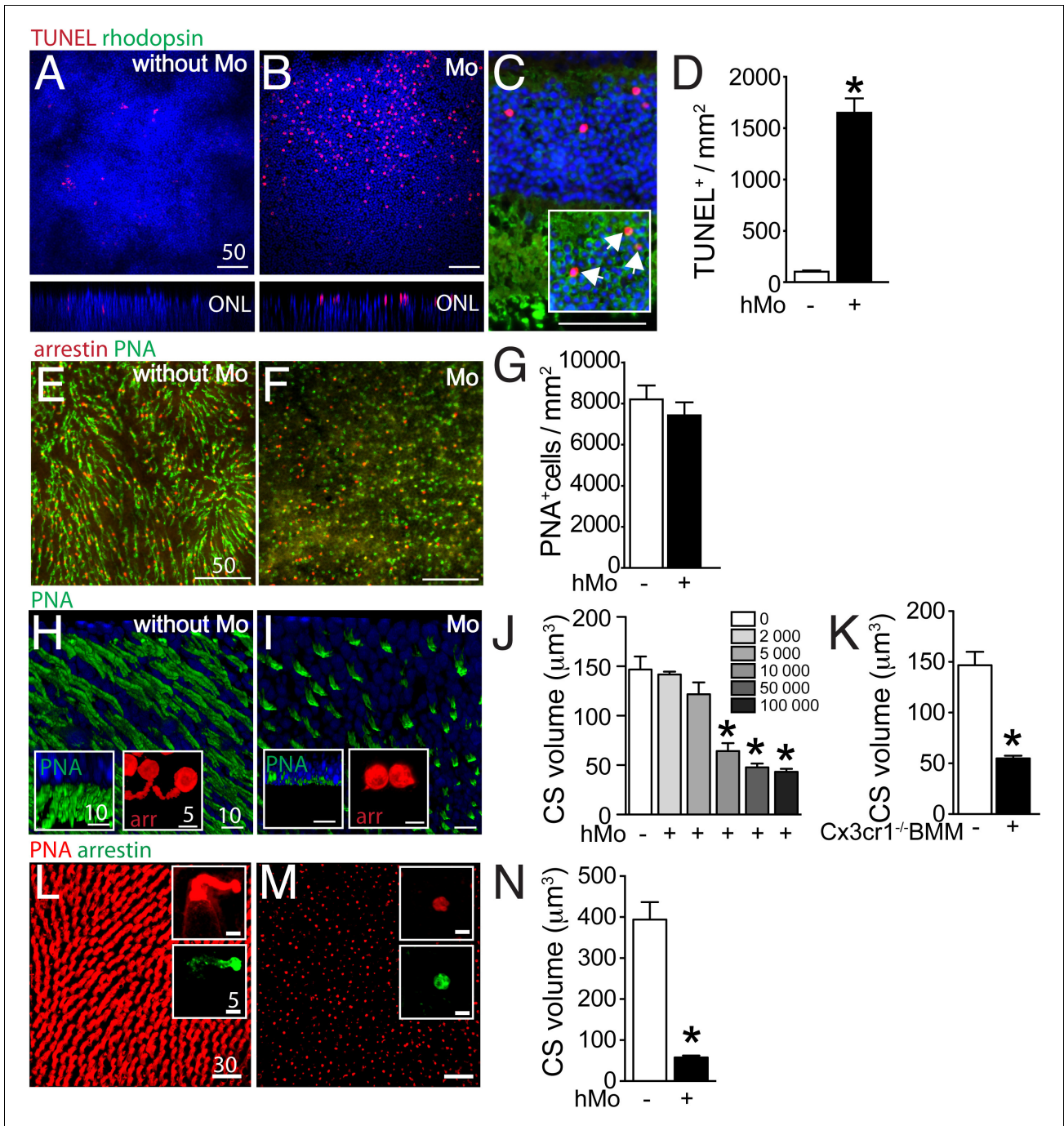


Figure 3. Evaluation of rods and cones in monocyte/retinal explant co-cultures. (A and B) Orthogonal projection of confocal Z stack images of the outer nuclear layer of TUNEL- (red), Hoechst nuclear dye- (blue) stained mouse retinal explants after 18 hr of culture (A) or co-culture with human monocytes (hMo, panel B). (C) TUNEL(red)/rhodopsin(green) co-staining of a section of a mouse retinal explant co-cultured with hMo (the inset represents a longer green exposure of the outer nuclear layer). (D) Quantification of TUNEL⁺ nuclei in mouse retinal explants cultured with or without hMo (n = 4/group, Mann Whitney *p=0,028). (E and F) Orthogonal projection of confocal Z stack images of the photoreceptor segments of mouse retinal explants after 18 hr of mono-culture (E) or co-culture with hMo (F) after cone arrestin (red)/peanut agglutinin (PNA, green) staining. (G) Quantification of cone numbers in retinal explants cultured with or without hMo (n = 10/group). (H and I) Oblique-, and perpendicular (insets) -3D Figure 3 continued on next page

Figure 3 continued

reconstruction views of confocal Z stack images of the photoreceptor segments of mouse retinal explants after 18 hr of mono-culture (H) or co-culture with hMo (I) after peanut agglutinin (PNA, green) and cone-arrestin (red, insets) staining. (J) Quantification of cone segment volume in mouse retinal explants cultured without or with the indicated numbers of hMos (n = 6/group, Mann Whitney *p<0,0004). (K) Quantification of cone segment volume in mouse retinal explants cultured without or with 100 000 Cx3cr1-deficient bone marrow-derived Mos (n = 4–6/group, Mann Whitney *p<0,0061). (L and M) Orthogonal-, and perpendicular (insets) -3D reconstruction views of confocal Z stack images of the photoreceptor segments of macaque retinal explants after 18 hr of mono-culture (L) or co-culture with hMo (M) after peanut agglutinin (PNA, red) and cone-arrestin (green) staining. (N) Quantification of cone segment volume in macaque retinal explants cultured without or with 100 000 hMos (n = 8/group, Mann Whitney *p<0,0002). hMo/Mo : human monocyte; arr: cone-arrestin; CS : cone segments; PNA : peanut agglutinin. Scale bar : A–F = 50 μ m; H and I = 10 μ m.

DOI: 10.7554/eLife.16490.004

immunological labeling for rhodopsin and TUNEL on sections prepared from the retinal explants revealed that the TUNEL⁺ nuclei of the ONL were positive for rhodopsin (Figure 3C inset) and not located at proximity to the inner segments, where cone nuclei are located (Figure 3C). Apoptosis was only observed in a minority of rods in these short-term co-cultures and rhodopsin⁺ rod segments were unremarkable in the culture condition (Figure 3C). Quantification of TUNEL⁺ nuclei/mm on 8 explants per group revealed a significant increase in TUNEL⁺ photoreceptors in co-culture with hMos compared to retinal explants cultured without hMos (Figure 3D) similar to co-cultures using Cx3cr1-deficient BMMs (Sennlaub et al., 2013). Next, we analyzed the cone population of PNA (green fluorescence) cone arrestin (red fluorescence) double-labeled mouse retinal explants after 18 hr of mono-culture (Figure 3E), or co-culture with hMos (Figure 3F). Quantification of cone arrestin⁺PNA⁺ cones (Figure 3G) revealed no influence of the presence of hMos on the number of cones after 18 hr of culture. However, the PNA-staining in hMo-exposed retinal flat-mounts appeared punctuated and the typical elongated shape of PNA⁺CS staining in retinas cultured without Mos had disappeared (Figure 3E and F). Oblique and perpendicular 3D reconstruction views of confocal microscopy Z-stacks of explant mono-cultures (Figure 3H), or co-culture with hMos (Figure 3I) reveals the near complete loss of PNA⁺CS in the hMo exposed explants. Similarly, arrestin staining revealed a severe shortening of arrestin⁺CS in the co-culture condition compared to controls (Figure 3H and I insets). Quantification of PNA⁺ volume (quantitated on the whole Z-stack, divided by the number of cones) in retinal explants co-cultured with increasing numbers of hMo confirms numerically a severe, significant reduction in PNA⁺CS volume as a function of hMos numbers (Figure 3J). To evaluate eventual artifacts due to interspecies incompatibilities we next quantified PNA⁺CS volumes of mouse retinal explants that we co-cultured for 18 hr with 100 000 Cx3cr1-deficient-mouse BMMs (which induces rod apoptosis similar to hMos [Sennlaub et al., 2013]). Our results revealed a similar, severe reduction in CS volume (Figure 3K). Furthermore, orthogonal 3D reconstruction views of confocal microscopy Z-stacks of PNA(red)/arrestin(green)-stained explants prepared from the para-central area of a non-human primate cultured without (Figure 3L), or with 100 000 hMos (Figure 3M) reveals a similar near complete loss of PNA⁺CS in the hMo exposed primate explants (Quantification Figure 3N). Again, the arrestin staining revealed a similar severe shortening of arrestin⁺CS (Figure 3L and M insets).

Taken together, our data show that Mos induce rod apoptosis and severe CS loss in a short-term retinal explant model. The CS loss was observed with the PNA and arrestin staining, with human blood-derived Mo and Cx3cr1-deficient-mouse BMMs, on mouse retinal explants and in explants from non-human primates, suggesting that the cone alterations were not the result of interspecies incompatibilities.

IL-1 β induces cone segment loss in retinal explant

Mos were not observed to physically infiltrate the outer segments or to ingest rhodopsin⁺ or PNA⁺ segments in the 18 hr co-culture (data not shown). Alternatively, the rapid CS reduction in the co-culture system might be due to the production of a secreted factor, such as inflammatory cytokines. We have previously shown that Cx3cr1-deficient mouse BMM induce rod apoptosis in the Mo/retinal explant co-cultures via IL-1 β (Hu et al., 2015). We showed that Cx3cr1-deficient BMMs constitutively secrete adenosine triphosphate (ATP), express increased surface P2RX7 receptor and secrete mature IL-1 β after transcriptional stimulation without a second exogenous stimulus (Hu et al., 2015), that is classically required for inflammasome activation and IL-1 β maturation (Schroder and Tschopp,

2010). Similarly, human blood monocytes constitutively release endogenous ATP, which leads to mature IL-1 β after transcriptional induction without a second exogenous stimulus (Netea et al., 2009). RT-PCRs of mRNA prepared from freshly isolated hMo, hMo cultured alone or with a retinal explant for 18 hr (both on polycarbonate filters) revealed that IL-1 β mRNA, but not IL18 mRNA, was significantly induced in hMos in the co-culture condition (Figure 4A), contrary to IL-6 and TNF α that were not induced (data not shown). PNA-staining of retinal explants cultured for 18 hr in the absence of Mos (Figure 4B) but with recombinant IL-1 β (Figure 4C), showed that IL-1 β was sufficient to severely reduce PNA⁺CS. Quantification of PNA⁺CS confirmed the significant, IL-1 β -induced volume loss (Figure 4D). In these experiments IL-1 β was used at a concentration of 50 ng/ml (in the range of concentration classically used in vitro) but the local IL-1 β concentration that cones are exposed to in the co-culture is difficult to estimate, as a gradient of IL-1 β is expected to form around the IL-1 β producing Mos. To directly evaluate the effect of locally produced IL-1 β we studied the effect of the IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) on the co-cultures. PNA-stained flatmounts of Mo/retinal co-cultures without (Figure 4E) or in the presence of IL-1Ra (Figure 4F) shows that IL-1 β -inhibition significantly protects against Mo-induced CS loss (Figure 4G).

In summary, these experiments show that IL-1 β , transcribed by Mos in the co-culture, is sufficient to induce CS reduction and necessary in Mo-induced CS loss.

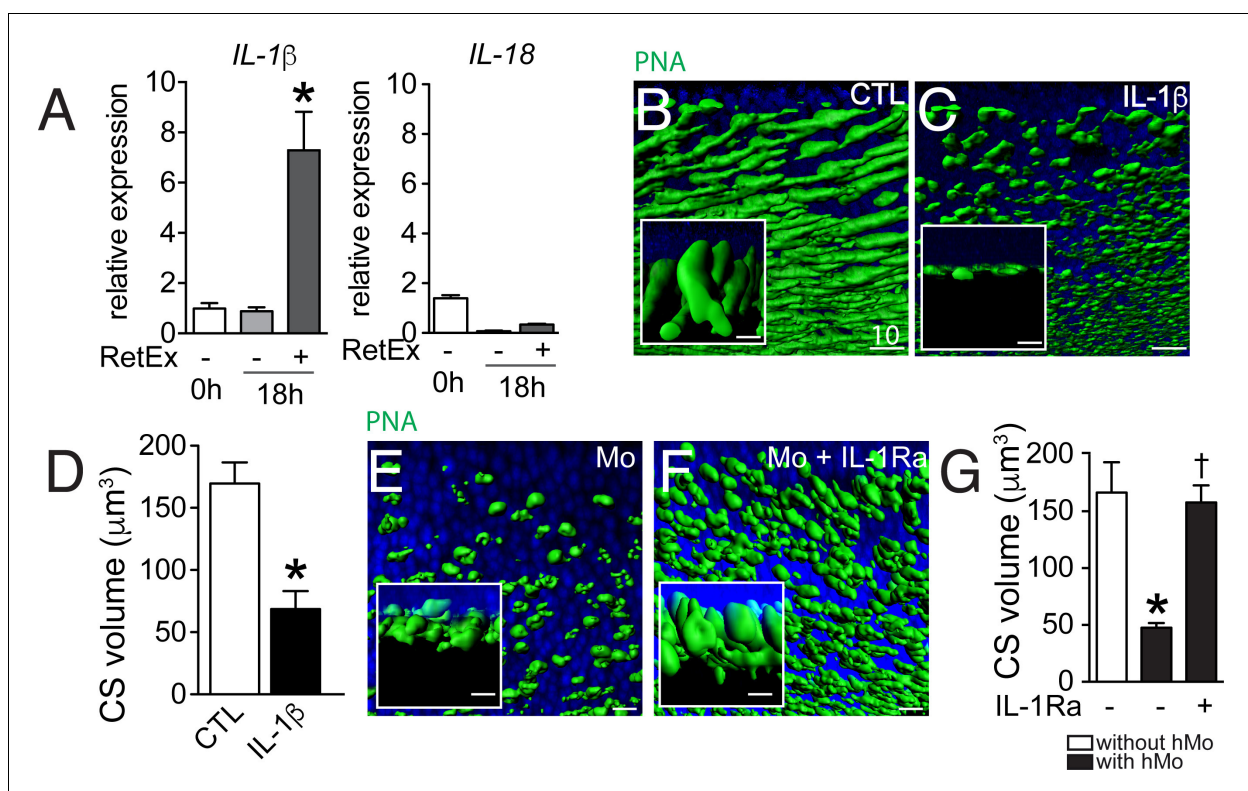


Figure 4. The influence of IL-1 β retinal explants co-cultures. (A) Quantitative RT-PCR of RT-PCR of IL-1 β and IL-18 normalized with S26 mRNA in fresh human monocytes (hMo), hMo cultured alone or with a retinal explant for 18 hr (both on polycarbonate filters, n = 5, ANOVA, Dunnett's post test *p=0,0079). (B and C) Oblique and perpendicular (insets) 3D reconstruction views of 18 hr peanut agglutinin (PNA)-stained retinal explant (B) and IL-1 β (50 ng/ml) exposed explant (C). (D) Quantification of cone segment volume in retinal explants cultured with or without IL-1 β (n = 6/group, Mann Whitney *p=0,0087). (E and F) Oblique and perpendicular (insets) 3D reconstruction views of 18 hr peanut agglutinin (PNA)-stained retinal explant co-cultured with human monocytes without (E) or with IL-1 receptor antagonist (F, 10 mg/ml). (G) Quantification of cone segment volume in Mo/retinal co-cultures with or without an IL-1 receptor antagonist (n = 6/group, Kruskal-Wallis, Dunn's post test *p=0,0022 versus 'without hMo'; †p=0,0182 versus "with hMo without IL1-Ra). RetEx: retinal explant; CTL: control; CS: cone segment; hMo: human Monocytes. Scale bar B, C, E, F = 10 μ m.

DOI: 10.7554/eLife.16490.005

IL-1Ra inhibits cone segment loss in subretinal inflammation in vivo

Our data show that CS loss in the TZ is associated with CD14⁺MP infiltration of the subretinal space in patients with GA and that Mos, and more precisely Mo-derived IL-1 β , induce a similar effect in vitro. However, the in vitro co-culture system is by nature a very artificial model, characterized by an excess of Mos, the absence of an underlying RPE, and rod and cone segment degeneration occurring in hours rather than days and weeks. To evaluate if subretinal inflammation and IL-1 β secretion observed in vivo induce CS loss in the presence of the RPE, we used a light-challenge model of *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice. We have previously shown that *Cx3cr1* deficiency in mice (lacking the tonic inhibitory signal from CX3CL1 expressing neurons [Zieger et al., 2014; Silverman et al., 2003]) leads to a strong increase of subretinal MP accumulation with age from the age of 6 months (Combadière et al., 2007) or after light-challenge or laser-injury (Combadière et al., 2007; Raoul et al., 2008; Ma et al., 2009). We showed that the subretinal infiltrate in these mice is composed of a mixture of microglial cells and pathogenic blood-derived Mos similar to GA lesions (Combadière et al., 2013). We demonstrated that IL-1 β protein is increased in *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice with age (Lavalette et al., 2011) and after a 4 day acute light-challenge that it induces rod cell apoptosis without affecting RPE morphology (Hu et al., 2015). *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice do not develop Drusen and RPE atrophy, but they do model MP accumulation between the RPE and the photoreceptor segments, as well as some degree of associated rod degeneration (Combadière et al., 2007; Sennlaub et al., 2013; Hu et al., 2015), somewhat similar to the TZ of patients with GA (Figures 1 and 2). Eventual cone alterations in *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice have not yet been described. Orthogonal 3D reconstruction views of confocal microscopy Z-stacks of CS in PNA-stained retinal flat-mounts of 2–3 months old *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice kept under normal light conditions (Hu et al., 2015) (Figure 5A) displayed the typical elongated shape of PNA⁺CS staining similar to freshly extracted wildtype retinal flat-mounts (data not shown). In contrast, PNA⁺CS of 4 day light-challenged *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice that accumulate GFP⁺ subretinal MPs, were shortened and punctuated (Figure 5B) throughout the retinal flatmounts. Daily subcutaneous IL-1Ra injections during the light-challenge of *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice prevented the change in CS morphology despite the presence of GFP⁺MPs in the subretinal space (Figure 5C). Quantification of PNA⁺CS volume in control and light-challenged C57BL6/J and *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice revealed a significant decrease in the light-challenged *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice (Figure 5D). Strikingly, IL-1 β inhibition, which had no effect on subretinal MP accumulation (Figure 5E), completely prevented the loss of PNA⁺CS volume in the light-challenged mice (Figure 5D).

Taken together, our data show that subretinal inflammation, observed in light-challenged *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice in vivo is associated with IL-1 β -dependent PNA⁺CS degeneration in the presence of the RPE similar to the results we obtained with Mos and recombinant IL-1 β in vitro.

Discussion

Our immunohistological study of human donor eyes reveals severe rod cell loss, little cone loss but CS degeneration peripheral to the margin of the RPE lesion that defines GA, confirming a recent morphological study (Bird et al., 2014). As previously reported, this TZ, characterized by a thinned outer nuclear layer despite the presence of the RPE, was of variable length but found in all specimens. We also confirm a surprisingly important number of residual cones that lack their CS in the AZ (Bird et al., 2014; Curcio, 2001). Interestingly, rhodopsin immunohistochemistry also identified some residual, segment-lacking rhodopsin⁺ rods within the RPE lesion.

Other investigators and we have previously shown that AZs of patients with GA contain numerous subretinal MPs (Combadière et al., 2007; Gupta et al., 2003; Lad et al., 2015; Sennlaub et al., 2013; Penfold et al., 2001). We also demonstrated that IBA1⁺MPs, but also blood-derived CCR2⁺MPs, invade the subretinal space of the TZ (Levy et al., 2015; Sennlaub et al., 2013). In the current study, we used immunohistochemistry on flat-mount preparations with an antibody recognizing a co-receptor of the toll like receptor 2 and 4, CD14, to visualize the infiltration of CD14⁺MPs (blood- or tissue-derived MPs) beyond the AZ in the TZ. Co-staining for PNA and cone arrestin confirmed the presence of residual cones in the AZ and the severe CS degeneration in the TZ of retinal flat-mounts and illustrates the close physical association of CS degeneration with CD14⁺MPs.

It is not clear why CS degenerate in the TZ, where the RPE is present. The degeneration might be a result of dysfunctional RPE prior to its degeneration, suggested by the observation of

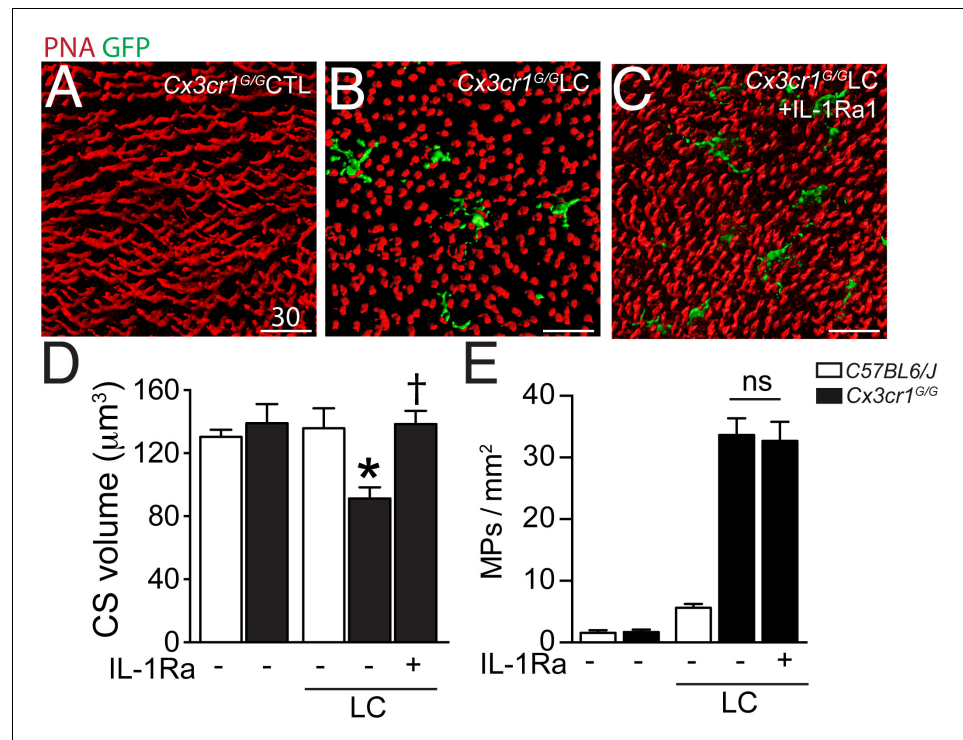


Figure 5. Cone segments in light-induced subretinal inflammation of C57BL/6/J and *Cx3cr1^{GFP/GFP}*-mice and the effect of pharmacological IL-1 β inhibition. (A–C) Orthogonal projections of confocal Z stack images of the photoreceptor segments of peanut agglutinin (PNA, red) stained *Cx3cr1^{GFP/GFP}*-mice (expressing GFP under the *Cx3cr1* promoter) that were kept under normal light conditions (A), or exposed to an inflammation-inducing light-challenge (LC) and treated with PBS (B) or IL-1 β receptor antagonist (C, IL-1Ra). (D and E) Quantification of cone segment volume (D) and subretinal mononuclear phagocytes (E) in normal light raised and LC-mice (n = 5–8/group; Kruskal-Wallis, Dunn's post test *p=0,0109 versus *Cx3cr1^{GFP/GFP}*-mice in normal light; †p=0,0028 versus light-challenged *Cx3cr1^{GFP/GFP}*-mice). PNA: peanut agglutinin; GFP: green fluorescent protein; IL-Ra: IL-1 β receptor antagonist LC: illuminated/light-challenged. Scale bar 30 μm .

DOI: 10.7554/eLife.16490.006

hyperfluorescence of the TZ (Sparrow *et al.*, 2010). However, to date, we do not know if the hyperfluorescence is due to an increase of fluorescent bisretinoids in the RPE (which could be a sign of RPE dysfunction), or to the superposition of several RPE cells or RPE-debris containing subretinal MPs in the TZ (Lad *et al.*, 2015; Sennlaub *et al.*, 2013; Gocho *et al.*, 2013; Zanzottera *et al.*, 2015). The observation that CS degeneration is also observed in RP patients with rod-gene mutations and unremarkable RPE (Mitamura *et al.*, 2013) further argues that an RPE-independent factor might participate in the degeneration.

Intriguingly, CS degeneration in RP (Gupta *et al.*, 2003), and as we show here in the TZ of patients with GA, is associated with the accumulation of subretinal MPs. We have previously shown that mouse MPs induce partial rod cell apoptosis *in vivo* and that wildtype mouse Mos and *Cx3cr1*-deficient Mos and MCs (characterized by excessive IL-1 β secretion) induce rod apoptosis in retinal explant co-cultures (Sennlaub *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2015). The influence of subretinal MPs on cones is unknown. Using Mo/retinal explant co-cultures, we here show that human blood-derived CD14⁺Mo induce some degree of rod apoptosis in retinal explants similar to mouse *Cx3cr1*-deficient mouse BMMs (Hu *et al.*, 2015). Interestingly, cone death was not observed, but all cones showed signs of severe CS degeneration. We show that IL-1 β was robustly transcribed in co-cultured Mos, that recombinant IL-1 β replicated CS degeneration, and that IL-1 β -inhibition reversed the Mo-induced CS degeneration.

The co-culture in vitro system, characterized by an excess of Mos, the lack of underlying RPE, mild rod apoptosis and quite severe CS degeneration occurring in hours rather than days and weeks, can however only be a rough approximation of the in vivo situation. The pattern of continuous rod (but not cone) apoptosis and CS degeneration over longer time periods would result in severe rod cell loss (as they don't regenerate), little cone loss but CS degeneration intriguingly similar to what is observed in the TZ of patients with GA.

To test whether IL-1 β -induced CS degeneration takes place in subretinal inflammation in vivo in the presence of the RPE, we analyzed cone morphology in inflammation-prone *Cx3cr1^{GFP/GFP}* mice. When subretinal MP accumulation was induced using a light-challenge (Hu et al., 2015), we observed CS degeneration, similar to the results we obtained with Mos in vitro. Furthermore, inhibition of IL-1 β , induced in these experimental conditions (Hu et al., 2015), prevented the CS degeneration in vivo, in accordance with the observation that IL-1 β potently induced CS degeneration in vitro.

Our study clearly demonstrates the association of subretinal MPs with CS degeneration in human samples and that MPs can induce a similar phenotype in vitro and in vivo, which strongly suggest that subretinal MPs participate in the degenerative changes in GA. Further studies of IL-1 β expression in human GA samples are needed to implicate this specific cytokine in the degenerative process in the human disease. However, IL-1 β has been shown to be strongly expressed in subretinal MPs of choroidal neovascular membranes in wet AMD (Oh et al., 1999) and CS degeneration is also observed adjacent to the fibrovascular membranes in disciform subretinal scars of wet AMD (Curcio, 2001). These observations suggest that an IL-1 β -dependent mechanism might exist in the human pathology.

Little is known about the cellular and molecular mechanisms of CS loss in GA. The observation that the degenerative changes appear peripheral to the RPE lesion and that similar changes are observed in RP (Gupta et al., 2003) and RP models (Punzo et al., 2009), suggest that other factors than RPE loss play a significant role. We clearly demonstrate that subretinal MPs, observed in both RP and the TZ, induce severe IL-1 β -dependent CS degeneration in the presence of morphologically normal RPE in vivo. Gupta et al. proposed several years ago that the subretinal inflammation secondary to rod degeneration in RP could be the 'missing link' to explain secondary CS and cone degeneration observed in RP (Gupta et al., 2003). CS maintenance in RP has recently been shown to depend on cone glucose uptake and aerobic glycolysis (Ait-Ali et al., 2015) that is stimulated by insulin (Punzo et al., 2009) and rod-derived cone viability factor (Ait-Ali et al., 2015). Inflammatory cytokines, including IL-1 β , inhibit insulin-dependent glucose uptake and are increasingly recognized to play an important role in insulin-resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes (Shoelson, 2006). IL-1 β -induced cone insulin resistance, decreased glucose uptake and subsequent cone starvation might explain the CS loss in RP and AMD.

Taken together, these results strongly suggest that infiltrating MPs observed in the TZ of patients with GA and in RP patients contribute importantly in the CS degeneration as they produce similar changes in vitro and in vivo. Inhibiting subretinal MP accumulation, or as we show IL-1 β inhibition, might help preserve CS and high acuity daytime vision in these patients.

Materials and methods

Donor eyes and immunohistochemistry

Donor eyes with a known history of AMD and controls were collected through the Minnesota Lions Eye Bank: 9 control maculae from 9 patients (5 men and 4 women; mean age 85 years \pm 2.4 SEM) and 15 GA donor maculae from 12 patients (5 men and 7 women; mean age 82.9 years \pm 2.2 SEM). Donor eyes without a history of eye disease and with a visible fovea on post-mortem funduscopy and a regular histology of the parafovea, recognizable by multilayered ganglion cell nuclei were used as control eyes. GA donor eyes had a known history of AMD, visible GA lesions on post-mortem fundus pictures, and histologically confirmed missing RPE and thinned photoreceptor cell layer in the lesion of the parafovea (multilayered ganglion cell layer) in the absence of subretinal vessels (as observed in neovascular AMD) or a fibroglial scar. Donor families gave informed consent in accordance with the eye bank's ethics committee. Postmortem fundus photographs were taken and the posterior segment was fixed 4 hr in 4% PFA, dissected, embedded in paraffin, and sectioned. The

anterior segment was dissected at the Minnesota Eye Bank, fundus photographs were taken, the posterior segment was fixed in PFA 4% for 4 hr and placed in ice cold PBS for shipping to our laboratory.

For immunohistochemistry on paraffin sections (5 control maculae from 5 patients and 10 GA donor maculae from 7 patients), the posterior segments were dissected to include the optic nerve, the macula and the central retina between the vessel arches, included in paraffin, and sectioned. The sections of the retina from donor eyes were stained as follow. After rehydration, antigen retrieval was performed in 70% formic acid for 15 min. After a pre-incubation step in 10% horse serum diluted in PBS 1X, slides were incubated with primary antibodies (anti-rhodopsin antibody [clone 4D2, Chemicon-Merck Millipore, Guyancourt, France; 1:500]; rabbit polyclonal anti-human cone arrestin antibody [DEI Luminaire Founder, Cheryl Craft; 1:25000] (Zhang *et al.*, 2001), L/M-cone opsin [Chemicon; 1:500]) and revealed with the appropriate secondary antibodies (Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France). Pictures of the retina were taken with a fluorescence microscope (Leica DM550B, Leica, Nanterre, France) and rods and cones quantified within the GA lesion, 0–200 μm and >200 μm from the lesion.

For flat-mount immunohistochemistry (4 age-matched control donor eyes and 5 donor eyes with central GA lesions), central (1.5 cm around the fovea/center) retina/RPE/choroid complexes were dissected from the donor eyes and sectioned by radial incisions into 8 triangular pieces that each contain a parafoveal part in the case of control eyes and AZ central, adjacent TZ, and non-atrophic peripheral part for GA donor eyes. In GA tissues, the retina of the atrophic part was subsequently carefully detached from underlying Bruch's membrane to which the atrophic retina is attached. Immunohistochemistry was performed on submerged samples with the primary antibodies anti-CD14 (MCA1218; 1:100 Serotec, Kidlington, UK), Peanut agglutinin Alexa 488 (ThermoFisher, Villebon-sur-Yvette, France; 1:50), anti-human cone arrestin antibody (LUMIF-hCAR; 1:10000), Hoechst nuclear stain (ThermoFischer; 1:1000), and revealed using appropriate fluorescent secondary antibodies (Molecular Probe). Preparations were observed with a Olympus FV1000 (Olympus, Rungis, France) confocal microscope.

Monocyte preparations, monocyte-retinal co-culture, and retinal explants

PBMCs were isolated from heparinized venous blood from healthy volunteer individuals. In accordance with the Declaration of Helsinki, volunteers provided written and informed consent for the human monocyte expression studies, which were approved by the Centre national d'ophtalmologie des Quinze-Vingt hospital (Paris, France) ethics committees (no. 913572). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from blood by 1-step centrifugation on a Ficoll Paque layer (GE Healthcare) and sorted with EasySep Human Monocyte Enrichment Cocktail (StemCells Technology, Grenoble, France). Human Mo were seeded on polycarbonate filters floating on DMEM for 2 hr. C57BL/6J mouse retina were prepared and placed with the photoreceptors facing 2000 to 100,000 adherent Mo for 18 hr at 37°C. In one set of experiments IL-1 β was inhibited by the IL-1 receptor antagonist (R&D, Lille, France, 10 mg/ml). Alternatively, retinal explants were cultured with recombinant IL-1 β (R&D; 50 ng/ml). In one set of experiments, we exposed eight 5 \times 5 mm (Sarks *et al.*, 1988) retinal explants dissected from the peri-central retina of a cynomolgus macaque to 100,000 human Mo or cultured eight explants without Mos. These experiments were done in accordance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. The donor retinal tissue samples were prepared from a control eye of an unrelated protocol that was approved by the Local Animal Ethics Committees and conducted in accordance with Directive 2010/63/EU of the European Parliament and French authorization C 92-032-02 regulation. The non human primate used in this study were cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) from foreign origin. *Macaca fascicularis* were housed under standard environmental conditions (12-h light–dark cycle, 22 \pm 1°C, 50% humidity) with free access to food and water. The animal was sacrificed by an overdose of barbiturate pentobarbital, the eyes were enucleated and retina dissected and prepared for retinal explant culture. For TUNEL staining (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics, Meylan, France) mouse retinal flat-mounts were fixed in 4% PFA for 30 min, washed in 1x PBS (pH 7.3), incubated for 90 min at 37°C with the reaction mixture and the reaction was stopped by washing with 1x PBS. For immunohistochemistry the flat-mounts were incubated with anti-mouse cone-arrestin antibody (Millipore, Guyancourt, France, #AB15282, 1:100; mouse retina explants) or rabbit polyclonal anti-human cone

arrestin antibody (DEI Luminaire Founder, Cheryl Craft; 1:25000; macaque retinal explants) and Peanut agglutinin Alexa 488 (ThermoFisher; 1:50; both mouse and macaque explants) overnight and revealed with an appropriate antibody (ThermoFisher). Nuclei were stained with Hoechst (ThermoFischer; 1:1000). Flat-mounts images were captured with a DM 5500 microscope (Leica) or an Olympus Confocal microscope. PNA⁺ cone S (CS) volume was quantified on confocal microscopy Z-stacks that encompass the 2 outermost nuclei of the ONL and the whole outer segments, and divided by the number of cones in the field.

Reverse transcription and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

RT-PCR was used to measure mRNA expression levels of *IL-1β*. Total RNA was extracted from fresh monocytes and monocytes cultured for 18 hr on polycarbonate filters floating on DMEM with or without an overlaying retinal explant using the Nucleospin RNA XS (740902, Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions and converted to cDNA using oligo (dT) as primer and Superscript II (Life Technologies). Each RT assay was performed in a 20 μL reaction. Subsequent RT-PCR was performed using cDNA, Sybr Green PCR Master Mix (Life Technologies) and the following sense and antisense primers: *IL-1β* (5'-CAT GGA ATC CGT GTC TTC CT-3' and 5'-GAG CTG TCT GCT CAT TCA CG-3'), *IL-18* (5'-GAC CAA GGA AAT CGG CCT C-3' and 5'-GCC ATA CCT CTA GGC TGG CT-3') or *RPS26* (5'-AAG TTT GTC ATT CGG ATT AAC-3' and 5'-AGC TCT GAA TCG TGG TG-3') (0.5 pmol/μL). Real-time PCR was performed using the Applied Biosystems StepOne real-time PCR systems (Applied Biosystems) with the following profile: 10 min at 95°C, followed by a total of 40 two-temperature cycles (15 sec at 95°C and 1 min at 60°C). To verify the purity of the products, a melting curve was produced after each run according to the manufacturer's instructions. Results were expressed as fold induction after normalization by *RPS26*.

In vivo light-challenge model

Cx3cr1^{GFP/GFP} mice were purchased from the Jackson Laboratories (Charles River Laboratories, Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France). All mice were negative for gene defects for the *Crb1^{rd8}*, *Pde6b^{rd1}*, and *Gnat2^{cpfl3}* mutations. Mice were housed in the animal facility under specific pathogen-free condition, in a 12 hr/12 hr light/dark (100–500 lux) cycle with water and normal diet food available *ad libitum*. All experimental protocols and procedures were approved by the local animal care ethics committee (N°00156.02).

Two- to three-month-old mice were adapted to darkness for 6 hr, pupils dilated and exposed to green LED light (starting at 2AM, 4500 Lux, JP Vezon equipment, Yzeure, France) for 4 days as previously described (Sennlaub *et al.*, 2013). Light-challenged mice were treated with daily subcutaneous injections of 100 μl of PBS or IL-1Ra (R&D; 1 mg/d/kg). On day 4, the mice were killed by CO₂ asphyxiation and enucleated. The globes were fixed in 4% PFA for 30 min, then rinsed in 1x PBS (pH 7.3). Retinal and RPE/choroid tissues were dissected intact from the globe, stained with Peanut agglutinin Alexa 594 (ThermoFisher; 1:50) and flat-mounted. Mononuclear phagocytes were visualized by using the *Cx3cr1* promoter-controlled GFP expression.

Quantification of cone outer segment volumes

Cone outer segment (OS) volumes were quantified using Imaris software (Bitplane) on stacks of confocal images which contain the entire photoreceptor outer and inner segments, of PNA-stained retinal flatmounts. 4 randomly chosen stacks (technical replicates) were taken per experimental retina or retinal explant. The software then calculated the volume of the PNA⁺ structures, which was subsequently divided by the number of PNA⁺ CS to yield the average individual CS volume in the stack. The CS volume of each retina or retinal explant (biological replicate) was calculated as the mean of the 4 individual stacks.

Statistical analysis

Sample sizes for our experiments were determined according to our previous studies. Each experiment with mouse retinal explants or light-challenge retina is representative of at least 3 independent experiments. Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software) was used for data analysis and graphic representation. Grubb's test was used to determine outliers. All values are reported as mean ± SEM. Statistical analysis was performed by one-way Anova analysis of variance followed by Bonferroni or

Dunnnett's post-test (multiple comparison of groups with equal variance and normal distribution), Kruskal-Wallis followed by a Dunns post-test (non-parametric multiple comparison of groups) or Mann-Whitney *U* test (non-parametric 2-group experiments) for comparison among means depending on the experimental design. The *n* and *p*-values are indicated in the figure legends.

Acknowledgements

We would like to thank Stéphane Fouquet and David Godefroy from the plateforme d'imagerie of the Institut de la Vision (IdV) for invaluable assistance in confocal microscopy. We are grateful to and Céline Nouvel Jaillard (IdV) and to Claire Maëlle Fovet et Joanna Demilly (MIRcen platform, CEA/INSERM, Fontenay-aux-Roses, France) for organizing and giving us access to cynomolgus macaques post-mortem retina for retinal explants. This work was supported by grants from INSERM, ANR blanc (MACLEAR, ANR- J15R365), Labex Lifesenses, Carnot, and by Association de Prévoyance Santé de ALLIANZ. Dr. Craft is the inaugural endowed Mary D Allen Chair in Vision Research, Doheny Eye Institute, and supported, in part, by NIH EY015851, EY03040 (DEI), and Research to Prevent Blindness (USC Ophthalmology).

Additional information

Funding

Funder	Grant reference number	Author
National Institutes of Health	EY015851	Cheryl Mae Craft
National Institutes of Health	EY03040	Cheryl Mae Craft
Association de Prévoyance Santé de ALLIANZ		Florian Sennlaub
Agence Nationale de la Recherche	MACLEAR, ANR- J15R365	Florian Sennlaub
Labex	LifeSenses	Florian Sennlaub
Carnot	International	Florian Sennlaub

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

CME, XG, FS, Conception and design, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Drafting or revising the article; HCM, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data, Drafting or revising the article; SA, ED, SL, SJH, LS, Acquisition of data, Analysis and interpretation of data; VF, Acquisition of data; CMC, Contributed unpublished essential data or reagents; J-AS, RT, MP, Analysis and interpretation of data, Contributed unpublished essential data or reagents

Author ORCIDs

Chiara M Eandi, <http://orcid.org/0000-0003-3656-1689>

Xavier Guillonnet, <http://orcid.org/0000-0001-7379-3935>

Florian Sennlaub, <http://orcid.org/0000-0003-4412-1341>

Ethics

Human subjects: Volunteers provided written and informed consent for the human monocyte expression studies, which were approved by the Centre national d'ophtalmologie des Quinze-Vingt hospital (Paris, France) ethics committees (no. 913572)

Animal experimentation: All experimental protocols and procedures were approved by the local animal care ethics committee (00156.02; C 92-032-02)

References

- Ait-Ali N**, Fridlich R, Millet-Puel G, Clérin E, Delalande F, Jaillard C, Blond F, Perrocheau L, Reichman S, Byrne LC, Olivier-Bandini A, Bellalou J, Moysse E, Bouillaud F, Nicol X, Dalkara D, van Dorsselaer A, Sahel JA, Lèveillard T. 2015. Rod-derived cone viability factor promotes cone survival by stimulating aerobic glycolysis. *Cell* **161**:817–832. doi: [10.1016/j.cell.2015.03.023](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.023)
- Bird AC**, Phillips RL, Hageman GS. 2014. Geographic atrophy: a histopathological assessment. *JAMA Ophthalmology* **132**:338–345. doi: [10.1001/jamaophthalmol.2013.5799](https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2013.5799)
- Blanks JC**, Johnson LV. 1984. Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells. A species comparison. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **25**:546–557.
- Chow A**, Brown BD, Merad M. 2011. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nature Reviews Immunology* **11**:788–798. doi: [10.1038/nri3087](https://doi.org/10.1038/nri3087)
- 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-Y, Chauvaud D, Jeanny J-C, Chemtob S, Behar-Cohen F, Sennlaub F. 2007. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *Journal of Clinical Investigation* **117**:2920–2928. doi: [10.1172/JCI31692](https://doi.org/10.1172/JCI31692)
- Combadière C**, Raoul W, Guillonneau X, Sennlaub F. 2013. Comment on “Ccl2, Cx3cr1 and Ccl2/Cx3cr1 chemokine deficiencies are not sufficient to cause age-related retinal degeneration” by Luhmann et al. (*Exp. Eye Res.* 2013; 107: 80. doi: [10.1016/j.exer.2013.02.002](https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.02.002))
- Cruz-Guillot F**, Saeed AM, Echegaray JJ, Duffort S, Ballmick A, Tan Y, Betancourt M, Viteri E, Ramkellawan GC, Ewald E, Feuer W, Huang D, Wen R, Hong L, Wang H, Laird JM, Sene A, Apte RS, Salomon RG, Hollyfield JG, et al. 2013. Infiltration of proinflammatory m1 macrophages into the outer retina precedes damage in a mouse model of age-related macular degeneration. *International Journal of Inflammation* **2013**:503725. doi: [10.1155/2013/503725](https://doi.org/10.1155/2013/503725)
- Curcio CA**. 2001. Photoreceptor topography in ageing and age-related maculopathy. *Eye* **15**:376–383. doi: [10.1038/eye.2001.140](https://doi.org/10.1038/eye.2001.140)
- Elnér VM**, Elnér SG, Bian ZM, Kindezelkii AL, Yoshida A, Petty HR. 2003. RPE CD14 immunohistochemical, genetic, and functional expression. *Experimental Eye Research* **76**:321–331. doi: [10.1016/S0014-4835\(02\)00310-X](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(02)00310-X)
- Gautier EL**, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, Helft J, Chow A, Elpek KG, Gordonov S, Mazloom AR, Ma'ayan A, Chua WJ, Hansen TH, Turley SJ, Merad M, Randolph GJ, Immunological Genome Consortium. 2012. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature Immunology* **13**:1118–1128. doi: [10.1038/ni.2419](https://doi.org/10.1038/ni.2419)
- Geissmann F**, Jung S, Littman DR. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**:71–82. doi: [10.1016/S1074-7613\(03\)00174-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00174-2)
- Gocho K**, Sarda V, Falah S, Sahel J-A, Sennlaub F, Benchaboune M, Ullern M, Paques M. 2013. Adaptive optics imaging of geographic atrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **54**:3673–3680. doi: [10.1167/iovs.12-10672](https://doi.org/10.1167/iovs.12-10672)
- Gupta N**, Brown KE, Milam AH. 2003. Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research* **76**:463–471. doi: [10.1016/S0014-4835\(02\)00332-9](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(02)00332-9)
- Hu SJ**, Calippe B, Lavalette S, Roubeix C, Montassar F, Housset M, Levy O, Delarasse C, Paques M, Sahel JA, Sennlaub F, Guillonneau X. 2015. Upregulation of P2RX7 in Cx3cr1-deficient mononuclear phagocytes leads to increased interleukin-1 β secretion and photoreceptor neurodegeneration. *Journal of Neuroscience* **35**:6987–6996. doi: [10.1523/JNEUROSCI.3955-14.2015](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3955-14.2015)
- Kohno H**, Chen Y, Kevany BM, Pearlman E, Miyagi M, Maeda T, Palczewski K, Maeda A. 2013. Photoreceptor proteins initiate microglial activation via Toll-like receptor 4 in retinal degeneration mediated by all-trans-retinal. *Journal of Biological Chemistry* **288**:15326–15341. doi: [10.1074/jbc.M112.448712](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.448712)
- Lad EM**, Cousins SW, Van Arnem JS, Proia AD. 2015. Abundance of infiltrating CD163+ cells in the retina of postmortem eyes with dry and neovascular age-related macular degeneration. *Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* **253**:1941–1945. doi: [10.1007/s00417-015-3094-z](https://doi.org/10.1007/s00417-015-3094-z)
- Lavalette S**, Raoul W, Houssier M, Camelo S, Levy O, Calippe B, Jonet L, Behar-Cohen F, Chemtob S, Guillonneau X, Combadière C, Sennlaub F. 2011. Interleukin-1 β inhibition prevents choroidal neovascularization and does not exacerbate photoreceptor degeneration. *The American Journal of Pathology* **178**:2416–2423. doi: [10.1016/j.ajpath.2011.01.013](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.01.013)
- Levy O**, Calippe B, Lavalette S, Hu SJ, Raoul W, Dominguez E, Housset M, Paques M, Sahel JA, Bemelmans AP, Combadière C, Guillonneau X, Sennlaub F. 2015. Apolipoprotein E promotes subretinal mononuclear phagocyte survival and chronic inflammation in age-related macular degeneration. *EMBO Molecular Medicine* **7**:211–226. doi: [10.15252/emmm.201404524](https://doi.org/10.15252/emmm.201404524)
- Ma W**, Zhao L, Fontainhas AM, Fariss RN, Wong WT. 2009. Microglia in the mouse retina alter the structure and function of retinal pigmented epithelial cells: a potential cellular interaction relevant to AMD. *PLoS One* **4**:e7945. doi: [10.1371/journal.pone.0007945](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007945)
- Mitamura Y**, Mitamura-Aizawa S, Katome T, Naito T, Hagiwara A, Kumagai K, Yamamoto S. 2013. Photoreceptor impairment and restoration on optical coherence tomographic image. *Journal of Ophthalmology* **2013**:1–7. doi: [10.1155/2013/518170](https://doi.org/10.1155/2013/518170)

- Netea MG**, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, van de Veerdonk FL, Ferwerda G, Heinhuis B, Devesa I, Funk CJ, Mason RJ, Kullberg BJ, Rubartelli A, van der Meer JW, Dinarello CA. 2009. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* **113**:2324–2335. doi: [10.1182/blood-2008-03-146720](https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-146720)
- Oh H**, Takagi H, Takagi C, Suzuma K, Otani A, Ishida K, Matsumura M, Ogura Y, Honda Y. 1999. The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **40**:1891–1898.
- Penfold PL**, Madigan MC, Gillies MC, Provis JM. 2001. Immunological and aetiological aspects of macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research* **20**:385–414. doi: [10.1016/S1350-9462\(00\)00025-2](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(00)00025-2)
- Punzo C**, Kornacker K, Cepko CL. 2009. Stimulation of the insulin/mTOR pathway delays cone death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Nature Neuroscience* **12**:44–52. doi: [10.1038/nn.2234](https://doi.org/10.1038/nn.2234)
- Raoul W**, Keller N, Rodéro M, Behar-Cohen F, Sennlaub F, Combadière C. 2008. Role of the chemokine receptor CX3CR1 in the mobilization of phagocytic retinal microglial cells. *Journal of Neuroimmunology* **198**:56–61. doi: [10.1016/j.jneuroim.2008.04.014](https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.04.014)
- Rutar M**, Natoli R, Provis JM. 2012. Small interfering RNA-mediated suppression of Ccl2 in Müller cells attenuates microglial recruitment and photoreceptor death following retinal degeneration. *Journal of Neuroinflammation* **9**:221. doi: [10.1186/1742-2094-9-221](https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-221)
- Sarks SH**. 1976. Ageing and degeneration in the macular region: a clinico-pathological study. *British Journal of Ophthalmology* **60**:324–341. doi: [10.1136/bjo.60.5.324](https://doi.org/10.1136/bjo.60.5.324)
- Sarks JP**, Sarks SH, Killingsworth MC. 1988. Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium. *Eye* **2**:552–577. doi: [10.1038/eye.1988.106](https://doi.org/10.1038/eye.1988.106)
- Schroder K**, Tschopp J. 2010. The inflammasomes. *Cell* **140**:821–832. doi: [10.1016/j.cell.2010.01.040](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040)
- Sennlaub F**, Auvynet C, Calippe B, Lavalette S, Poupel L, Hu SJ, Dominguez E, Camelo S, Levy O, Guyon E, Saederup N, Charo IF, Rooijen NV, Nandrot E, Bourges JL, Behar-Cohen F, Sahel JA, Guillonnet 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 Molecular Medicine* **5**:1775–1793. doi: [10.1002/emmm.201302692](https://doi.org/10.1002/emmm.201302692)
- Shoelson SE**. 2006. Inflammation and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* **116**:1793–1801. doi: [10.1172/JCI29069](https://doi.org/10.1172/JCI29069)
- Silverman MD**, Zamora DO, Pan Y, Texeira PV, Baek S-H, Planck SR, Rosenbaum JT. 2003. Constitutive and inflammatory mediator-regulated fractalkine expression in human ocular tissues and cultured cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **44**:1608–1615. doi: [10.1167/iovs.02-0233](https://doi.org/10.1167/iovs.02-0233)
- Sparrow JR**, Yoon KD, Wu Y, Yamamoto K. 2010. Interpretations of fundus autofluorescence from studies of the bisretinoids of the retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **51**:4351–4357. doi: [10.1167/iovs.10-5852](https://doi.org/10.1167/iovs.10-5852)
- Suzuki M**, Tsujikawa M, Itabe H, Du ZJ, Xie P, Matsumura N, Fu X, Zhang R, Sonoda KH, Egashira K, Hazen SL, Kamei M. 2012. Chronic photo-oxidative stress and subsequent MCP-1 activation as causative factors for age-related macular degeneration. *Journal of Cell Science* **125**:2407–2415. doi: [10.1242/jcs.097683](https://doi.org/10.1242/jcs.097683)
- Zanzottera EC**, Messinger JD, Ach T, Smith RT, Curcio CA. 2015. Subducted and melanotic cells in advanced age-related macular degeneration are derived from retinal pigment epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **56**:3269–3278. doi: [10.1167/iovs.15-16432](https://doi.org/10.1167/iovs.15-16432)
- Zhang Y**. 2001. Cone arrestin expression and induction in retinoblastoma cells. In: Anderson R. E, LaVail M. M, Hollyfield J. G (Eds). *New Insights Into Retinal Degeneration Diseases*. Kluwer Academic, Plenum Publishers: New York. p 309–318. doi: [10.1007/978-1-4615-1355-1_33](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1355-1_33)
- Zieger M**, Ahnelt PK, Uhrin P. 2014. CX3CL1 (fractalkine) protein expression in normal and degenerating mouse retina: in vivo studies. *PLoS One* **9**:e106562. doi: [10.1371/journal.pone.0106562](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106562)

Article 2 : La production d'IL-1 β par les phagocytes mononucléés sous-rétiens induit la dégénérescence des bâtonnets en dérégulant l'homéostasie rétinienne du glutamate :

1) Situation du sujet :

La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA) est la première cause de déficience visuelle dans les pays industrialisés (Klein et al., 2004). L'atrophie géographique, l'une des formes cliniques de DMLA tardive, est caractérisée par une lésion progressive de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) et des photorécepteurs (PRs) (Sarks, 1976; Sarks et al., 1988). Dans l'atrophie géographique, les phagocytes mononucléés s'accumulent dans l'espace sous-rétinien (Gupta et al., 2003), et sont associés à la perte des photorécepteurs (Sennlaub et al., 2013). Nous avons montré que l'IL-1 β produite par les phagocytes mononucléés est responsable de la mort des bâtonnets (Hu et al., 2015) et de la perte des segments de cônes (Eandi et al., 2016).

La sécrétion d'IL-1 β est associée à de nombreuses pathologies neuro-dégénératives du système nerveux central (Koprach et al., 2008; Rossi et al., 2012; Shaftel et al., 2008), mais son récepteur IL-1R1 est faiblement exprimé chez les neurones par rapport aux cellules gliales (Huang et al., 2011). Il est généralement admis qu'IL-1 β n'est pas directement neurotoxique, mais potentialise la mort neuronale via les cellules gliales (Fogal et al., 2007) en induisant une libération excessive de glutamate (Jackman et al., 2012b). A l'état basal, la concentration extracellulaire de glutamate est très finement régulée (Jablonski et al., 2011; Reichenbach et al., 1993) afin ne pas atteindre une concentration excitotoxique pour les neurones (Ishikawa, 2013) comme les photorécepteurs (Delyfer et al., 2005). Dans la rétine, IL-1 β induit (i) une diminution de la recapture de glutamate par les cellules gliales de Müller (Chen et al., 2014) et (ii) augmente la transcription et l'activité du transporteur cystine/glutamate x_c⁻, favorisant la sécrétion de glutamate (Fogal et al., 2007).

Nous avons émis l'hypothèse que l'IL-1 β produite par les phagocytes mononucléés induit une perturbation de l'homéostasie du glutamate, entraînant l'augmentation de la concentration extracellulaire en glutamate et induisant la perte secondaire des bâtonnets.

2) Résultats :

2.1) IL-1 β induit indirectement la mort des bâtonnets :

Afin de confirmer le lien entre IL-1 β et dégénérescence des photorécepteurs, nous avons cultivé des explants rétiens de souris en présence d'IL-1 β : nos résultats montrent une augmentation significative du marquage TUNEL dans la couche des photorécepteurs. Nous montrons aussi que l'IL-1 β seule ne suffit pas à induire la mort de photorécepteurs

isolés, mais induit la modification de gènes impliqués dans la régulation homéostatique du glutamate sur explant entier. Nous observons une diminution de l'expression des transporteurs au glutamate, et une surexpression de l'échangeur cystine/glutamate x_c^- , associée à une augmentation de la concentration extracellulaire en glutamate

2.2) L'inhibition des récepteurs glutamatergiques prévient l'apoptose des bâtonnets :

L'IL-1 β induit une libération excessive de glutamate dans la rétine, et l'excès de glutamate induit un effet excitotoxique sur les neurones (Choi et al., 1987). Nous avons donc testé l'effet du CNQX - un inhibiteur des récepteurs glutamatergiques - sur des explants rétiniens cultivés en présence d'IL-1 β . Nous montrons que l'inhibition des récepteurs au glutamate suffit à prévenir la mort des bâtonnets induite par l'IL-1 β , suggérant l'induction d'un effet excitotoxique du glutamate.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons ensuite cultivé des explants rétiniens en présence d'une concentration élevée de glutamate. Nos résultats montrent que le glutamate seul suffit à induire l'apoptose des bâtonnets, mais n'induit pas la dégénérescence des segments externes des cônes.

2.3) La cystine exogène permet de sauver les photorécepteurs de la dégénérescence induite par l'IL-1 β :

L'inhibition des récepteurs glutamatergiques n'étant pas une perspective thérapeutique viable dans un tissu nerveux (Lees, 1998), nous avons testé l'effet de la cystine, un acide aminé essentiel à la synthèse du peptide antioxydant glutathion. Nos résultats montrent qu'une forte concentration de cystine permet d'inhiber la neuro-toxicité induite par l'IL-1 β .

3) Conclusions :

Les données que nous avons obtenues démontrent que la production d'IL-1 β induit une diminution de l'expression des transporteurs au glutamate, et une surexpression de l'échangeur cystine/glutamate x_c^- , aboutissant à l'augmentation de la concentration extracellulaire en glutamate. Nous montrons que l'excès de glutamate exerce un effet excitotoxique sur les bâtonnets et non les cônes, et que l'inhibition des récepteurs glutamatergiques non-NMDA protège les bâtonnets. Enfin, nos résultats suggèrent que l'utilisation de cystine est une perspective thérapeutique envisageable pour atténuer la toxicité induite par les macrophages contre les bâtonnets.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

1) Résumé des résultats de la thèse

Les travaux présentés ci-dessus démontrent l'accumulation de phagocytes mononucléés dans l'espace sous-rétinien de patients atteints de DMLA atrophique, au niveau de la zone atrophique, et de la zone de transition qui la borde. Nous montrons que la présence de macrophages est associée à la dégénérescence des photorécepteurs, caractérisée par l'apoptose des bâtonnets, et la perte des segments de cônes. Les macrophages induisent un phénotype similaire *in vivo* et *ex vivo*, et nos résultats montrent qu'IL-1 β est nécessaire à l'induction de la dégénérescence des photorécepteurs par les macrophages. Nos résultats montrent aussi qu'IL-1 β induit indirectement l'apoptose des bâtonnets, et crée une perturbation de l'homéostasie rétinienne du glutamate, traduite par l'augmentation de la concentration extracellulaire en glutamate. Nous montrons que CNQX - un inhibiteur des récepteurs glutamatergiques de type non-NMDA - permet de prévenir la perte des bâtonnets induite par IL-1 β , établissant l'existence d'un mécanisme excitotoxique induit par le glutamate. Enfin, nous montrons que l'apport exogène en cystine suffit à favoriser la survie des photorécepteurs en dépit de l'effet induit par IL-1 β , probablement en rétablissant le fonctionnement du métabolisme antioxydant.

2) Considérations générales sur la persistance sous-rétinienne des macrophages

Nous allons voir comment ces phagocytes mononucléés sont recrutés, et quels facteurs peuvent modifier leur survie dans l'espace sous-rétinien, favorisant leur accumulation chronique.

Dès le stade précoce de la DMLA - maculopathie liée à l'âge (MLA) - les phagocytes mononucléés s'accumulent en grand nombre au niveau des drusens sous-rétiens (Levy et al., 2015a) le long de l'épithélium pigmentaire (EPR). Cette observation suggère que la MLA est associée à un dysfonctionnement du potentiel immunosuppresseur de l'EPR, prévenant l'élimination de ces phagocytes. Il est difficile de déterminer si c'est la perte de fonction de l'EPR qui permet l'accumulation de macrophages, mais il apparaît que la persistance de l'inflammation sous-rétinienne associée à la présence de phagocytes mononucléés est liée à la progression de la maladie vers l'atrophie géographique. L'inhibition du recrutement CCR2-dépendant des macrophages (Guo et al., 2012) ou l'atténuation pharmacologique des monocytes (Kohno et al., 2013) diminuent la dégénérescence rétinienne, montrant clairement l'importance des macrophages inflammatoires dans la dégénérescence des photorécepteurs. Ces résultats sont confortés par l'étude de Sennlaub et al, montrant que l'inhibition de l'axe CCL2/CCR2 atténue l'inflammation sous-rétinienne chez la souris déficiente en Cx3cr1, réduisant la dégénérescence des photorécepteurs (Sennlaub et al., 2013).

2.1) Les polymorphismes génétiques

Ces résultats ne justifient pas la persistance de l'inflammation sous-rétinienne, mais comme nous l'avons développé dans l'introduction, l'association entre certains polymorphismes génétiques – comme CFH ou APOE - et la prévalence de développer une des formes tardives de la DMLA pourrait permettre d'éclaircir certains mécanismes. En effet, certains travaux publiés par notre équipe ont permis de montrer comment la liaison de CFH au récepteur CD11b/CD18 interfère avec l'interaction TSP-1/CD47 - qui favorise normalement l'élimination des macrophages (Calippe et al., 2017). D'autres données non publiées montrent que CD47 et TSP-1 sont essentiels à la potentialisation de l'élimination des macrophages par le système Fas/FasL. Ainsi, l'utilisation d'un agoniste du récepteur CD47 pourrait permettre de restaurer l'effet immunosuppresseur de l'EPR chez les patients atteints de DMLA. De plus, d'autres travaux ont montré l'association entre la surexpression d'APOE et IL-6 dans l'inflammation sous-rétinienne, induisant une diminution de l'expression de FasL par les cellules de l'EPR (Levy et al., 2015a). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'IL-6 pourrait permettre d'inhiber cet effet chez les patients atrophiques, et là encore rétablir l'effet immunosuppresseur de l'EPR.

2.2) Exposition à la lumière

L'exposition à la lumière est un protocole couramment utilisé dans notre équipe pour induire l'inflammation sous-rétinienne - chez la souris déficiente en Cx3cr1 le plus souvent. Quand ces souris sont soumises à un cycle jour/nuit classique en animalerie (250 lux lorsque les lumières sont allumées) tout au long du vieillissement, les macrophages s'accumulent dans l'espace sous-rétinien avec l'âge : mais lorsqu'elles sont maintenues à l'obscurité, on n'observe pas de telle accumulation (Combadière et al., 2007). Ce résultat montre que l'accumulation de macrophages est dépendante de l'exposition à la lumière. Un modèle de challenge lumineux a donc été développé, afin d'induire l'inflammation sous-rétinienne plus rapidement chez de jeunes souris, en soumettant les animaux pendant 4 jours à une intensité lumineuse de 4500 lux. Là encore, on observe une forte accumulation sous-rétinienne de phagocytes mononucléés, alors que ce n'est pas le cas chez les souris WT (Sennlaub et al., 2013). Lorsque des animaux déficients en FasL, TSP-1 ou CD47 – c'est-à-dire des facteurs impliqués dans la résolution de l'inflammation - sont soumis au même challenge lumineux, on observe une forte accumulation de macrophages inflammatoires (Calippe et al., 2017; Levy et al., 2015a) : ce résultat suggère que les souris WT exposées à la lumière ne présentent pas d'inflammation sous-rétinienne car les macrophages sont efficacement éliminés au fur et à mesure, et non pas parce qu'ils ne sont pas recrutés.

On peut ainsi imaginer qu'un patient humain présentant certains facteurs de risque, comme l'âge et une prédisposition génétique entravant la résolution de l'inflammation, pourrait développer une inflammation sous-rétinienne importante et chronique après

une exposition prolongée à des fortes intensités lumineuses. A l'heure actuelle, aucun lien mécanistique n'a été clairement établi entre la lumière et l'activation des macrophages, mais on peut supposer l'induction de stress photo-oxydatif dans les segments externes des photorécepteurs, favorisant le recrutement des monocytes et/ou la diminution de l'effet immunosuppresseur de l'EPR.

2.3) Stress oxydant

Certains travaux ont mis en évidence un lien entre l'apport massif de stress oxydant dû à la fumée du tabac, et une diminution de l'expression du facteur de transcription Nrf2 au niveau de l'EPR, ce qui pourrait affecter sa capacité à lutter contre le stress oxydant (Cano et al., 2010; Datta et al., 2017). L'exposition chronique à la fumée de cigarette est aussi connue pour être un facteur aggravant dans de nombreuses pathologies inflammatoires ou certaines pathologies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde (Vessey et al., 1987). La consommation de tabac pourrait ainsi participer indirectement à l'accumulation sous-rétinienne de macrophages, et favoriser le développement de la DMLA, mais aucun mécanisme reliant ces deux phénomènes n'a encore été clairement établi.

2.4) Obésité & inflammation systémique

Chez les patients obèses, les macrophages sont présents dans un état activé, et on mesure au niveau des tissus adipeux et du sang circulant une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires (Park et al., 2005). Or, plusieurs études montrent que l'insulino-résistance et le développement du diabète de type 2 peuvent être induits par la production d'IL-1 β (Jager et al., 2007), d'IL-6 (Vozarova et al., 2001), de TNF- α (Hotamisligil et al., 1993) et de CCL2 (Kawano et al., 2016). Ces résultats suggèrent que le comportement alimentaire a un effet particulièrement fort sur la polarisation des macrophages, et favorise leur activation tout en les maintenant dans un état pro-inflammatoire. En plus d'avoir un impact systémique, l'alimentation joue aussi un rôle sur la composition du microbiote intestinal, que l'on sait impacter fortement le fonctionnement du système immunitaire (Sommer and Bäckhed, 2013). Une étude publiée en 2016 a montré que des souris soumises à un régime riche en graisses présentent des perturbations de la composition de leur microbiote intestinal, favorisant le développement de lésions néo-vasculaires associées à la DMLA dans un modèle induit par photo-coagulation laser (Andriessen et al., 2016). Andriessen et al établissent ainsi que l'induction de la dysbiose déclencherait une inflammation systémique en augmentant la perméabilité intestinale aux PAMPs (Andriessen et al., 2016).

En conclusion le surpoids, et plus généralement le comportement alimentaire, ont un impact profond sur l'excitabilité des macrophages, et pourraient effectivement contribuer à l'augmentation du risque de développer la DMLA même si là encore aucun

lien direct n'a été établi.

3) Perspectives thérapeutiques

Actuellement, il n'existe pas de traitement pour soigner ou ralentir la progression de l'atrophie géographique. Comme nous l'avons vu, les raisons pour lesquelles les phagocytes mononucléés peuvent s'accumuler dans l'espace sous-rétinien sont variables, et il est difficile de développer une thérapie qui les cible efficacement. Notre travail a donc consisté à identifier les mécanismes de toxicité induits par les macrophages, afin de lutter contre leurs effets. Nous présentons ci-dessous quelques pistes envisageables.

3.1) Inhibition des récepteurs au glutamate

Nous avons montré que l'IL-1 β induit une libération excessive de glutamate dans le milieu extracellulaire rétinien, entraînant la mort des bâtonnets via un mécanisme excitotoxique impliquant les récepteurs AMPA/Kainate. On pourrait donc envisager d'utiliser des inhibiteurs spécifiques de ces récepteurs, afin de prévenir la dégénérescence des bâtonnets.

De nombreuses études ont précédemment été conduites dans l'objectif d'inhiber les récepteurs glutamatergiques et favoriser la neuro-protection. Malheureusement, nombre d'entre elles visaient les récepteurs de type NMDA (Lai et al., 2014), ce qui ne serait probablement pas efficace dans notre modèle étant donné que les récepteurs NMDA ne sont à notre connaissance pas ou peu exprimés par les photorécepteurs.

On sait que la sur-stimulation des récepteurs non-NMDA entraîne un fort influx de Ca²⁺ qui induit secondairement la mort neuronale. Le topiramate est un médicament antiépileptique utilisé pour diminuer l'excitabilité neuronale et favoriser la neuroprotection, en réduisant l'influx de Ca²⁺ induit par la stimulation des récepteurs AMPA/Kainate (Poulsen et al., 2004). Ce médicament pourrait donc présenter une perspective thérapeutique intéressante : en effet, le glutamate est le neurotransmetteur excitateur rétinien majeur, et inhiber totalement ses récepteurs rendrait probablement les patients aveugles. Il est préférable d'envisager une approche similaire à celle du topiramate, réduisant l'excitabilité des neurones, sans totalement l'inhiber.

Enfin, d'autres approches plus générales ont été développées, par exemple via l'utilisation du fingolimod (FTY720), un modulateur des récepteurs de la sphingosine-1-phosphate utilisé dans la sclérose en plaque. Le fingolimod exerce un effet neuroprotecteur anti-excitotoxique de manière indirecte, en régulant négativement la neuro-inflammation induite par les macrophages (Cipriani et al., 2015).

3.2) Inhibition du système x_c^-

Nous avons montré que l'IL-1 β induit une surexpression du système x_c^- dans les cellules gliales de Müller, associée à la libération accrue de glutamate. On pourrait donc envisager l'inhibition de cet anti-porteur, afin de prévenir en partie l'accumulation extracellulaire de glutamate.

Dans le gliome, l'expression du système x_c^- est augmentée, alors que celle des transporteurs au glutamate comme EAAT2 est compromise. En conséquence, le glutamate libéré par les gliomes s'accumule dans le milieu extracellulaire, et induit la mort par excitotoxicité des neurones environnants. Ces conditions fournissent un environnement idéal au développement des cellules du gliome, qui se répandent alors plus facilement (Ye et al., 1999). Ces découvertes ont stimulé la recherche d'inhibiteurs spécifiques du système x_c^- , et conduit à la découverte de deux agents pharmacologiques : la (S)-4-carboxyphenylglycine (S-4CPG) (Ye and Sontheimer, 1999), et la sulfasalazine (Gout et al., 2001). L'inconvénient de la S-4CPG est qu'elle n'est pas exclusivement spécifique du système x_c^- , et inhibe les récepteurs métabotropiques du groupe I (Doherty et al., 1999). La sulfasalazine présente l'intérêt d'avoir déjà été approuvée par le FDA dans le traitement de pathologies intestinales inflammatoires comme la maladie de Crohn. Cependant, la prise de sulfasalazine n'est autorisée que par voie orale, et celle-ci est métabolisée dans l'intestin par les azoréductases, ce qui la rend inefficace pour inhiber le système x_c^- après avoir rejoint la circulation sanguine (Azadkhan et al., 1982). Si elle était autorisée, l'injection intra-vitréenne de sulfasalazine pourrait peut-être s'avérer efficace, ou l'utilisation d'autres analogues pourrait être envisagée (Shukla et al., 2011).

Mais il faut être prudent, car la régulation de l'équilibre homéostatique d'un tissu tumoral ne peut pas être transposée *stricto sensu* à celle de la rétine fonctionnelle, et comme nous l'avons vu, il est très compliqué de manipuler les équilibres du glutamate au sein de la rétine. Le système x_c^- est un anti-porteur essentiel pour fournir les cellules en cystine (Mysona et al., 2009), un acide aminé requis pour la synthèse du glutathion antioxydant (Cooper and Kristal, 1997). Ainsi, selon le contexte, le système x_c^- semble exercer des effets ambivalents sur la survie neuronale. Dans certains modèles, son inhibition a été associée à l'accumulation de stress oxydant – résultant du défaut dans la synthèse de glutathion – et à la mort neuronale (Murphy et al., 1989b; Shih et al., 2006). Dans d'autres modèles, l'accroissement de l'activité du système x_c^- a été associée à l'apoptose neuronale (Domercq et al., 2007; Fogal et al., 2007; Liu et al., 2014).

Nous prévoyons donc d'explorer l'effet de l'inhibition du système x_c^- dans notre modèle d'explants rétinien, cultivés en présence d'IL-1 β .

3.3) Inhibition du stress oxydant induit par l'excitotoxicité

Nous avons montré que l'apport exogène de cystine permet de réduire l'apoptose des bâtonnets induite par l'IL-1 β . Ce résultat suggère que l'augmentation de la concentration extracellulaire en cystine permet de faire à nouveau fonctionner le système x_c^- exprimé par les photorécepteurs, en contrebalançant son inhibition induite par la forte concentration extracellulaire en glutamate. On peut penser que fournir les bâtonnets en cystine permet de remettre en marche la machinerie antioxydante, favorisant leur survie dans un environnement excitotoxique.

Les photorécepteurs sont particulièrement sensibles aux stress oxydatif de par leur consommation importante d'oxygène. Nous prévoyons donc d'exploiter cette piste en utilisant des inhibiteurs spécifiques permettant de contrôler l'accumulation de stress oxydant induite par l'excitotoxicité. De toutes les cibles potentielles, le peroxy-nitrite présente un intérêt particulier car contrairement aux ROS, il ne présente pas de fonction physiologique reconnue (Pacher et al., 2007). La production de peroxy-nitrite résulte de l'interaction entre l'oxyde nitrique et le superoxyde, et induit des dommages à l'ADN et aux mitochondries, ainsi que la déplétion des réserves antioxydantes (Beckman, 1996). Afin de contrer son effet, nous envisageons l'utilisation du sodium disulfenton (NXY-059, ou Cerovive), un composé capable d'éliminer très efficacement le peroxy-nitrite, et qui a déjà montré son efficacité en tests cliniques (Lees et al., 2006). L'utilisation d'acide urique pourrait aussi être envisagée : ce composé prévient la mort cellulaire induite par le glutamate (Yu et al., 1998), et supprime les dommages induits par les ROS ou le peroxy-nitrite (Squadrito et al., 2000). De même, l'edaravone, une drogue anti-oxydante éliminant les résidus hydroxyl et peroxy ainsi que les radicaux superoxydes, a déjà montré sa capacité à inhiber les mécanismes pathologiques associés à l'inflammation chronique (Lapchak, 2010), et son utilisation pourrait être envisagée dans des modèles d'inflammation sous-rétinienne.

3.4) Mode d'application

La rétine est un tissu nerveux qui présente l'avantage d'être relativement accessible. L'injection intra-vitréenne permet d'injecter localement directement dans le vitré, en traversant la sclère au niveau de l'ora serrata. Cette technique est couramment utilisée - dans le traitement de la DMLA exsudative par exemple, avec l'injection d'anticorps anti-VEGF inhibant la néo-vascularisation. Ce mode d'injection est relativement bien toléré chez les patients, et présente peu de complications graves, ce qui en rend possible la pratique jusqu'à une fréquence d'une injection par mois. De plus, la présence de la barrière hémato-rétinienne permet d'éviter la diffusion dans la circulation systémique de protéines ayant un poids moléculaire supérieur à 30kDa.

Mais la découverte d'un médicament à application topique, c'est-à-dire qui pourrait être appliqué sur la surface de l'œil au niveau de la conjonctive, serait un progrès remarquable pour la qualité de vie des patients. Il a été montré que l'application topique

de peptides inhibiteurs de calpaïnes permet de prévenir la dégénérescence des photorécepteurs dans certains modèles (Ozaki et al., 2012). Ainsi, un antioxydant pourrait être un très bon candidat pour ce type d'approche.

BIBLIOGRAPHIE

- Ach, T., Huisinigh, C., McGwin, G., Messinger, J.D., Zhang, T., Bentley, M.J., Gutierrez, D.B., Ablonczy, Z., Smith, R.T., Sloan, K.R., et al. (2014). Quantitative Autofluorescence and Cell Density Maps of the Human Retinal Pigment Epithelium. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* *55*, 4832.
- Adams, M.K.M., Simpson, J.A., Aung, K.Z., Makeyeva, G.A., Giles, G.G., English, D.R., Hopper, J., Guymer, R.H., Baird, P.N., and Robman, L.D. (2011). Abdominal Obesity and Age-related Macular Degeneration. *Am. J. Epidemiol.* *173*, 1246–1255.
- Agarwal, A., Rhoades, W.R., Hanout, M., Soliman, M.K., Sarwar, S., Sadiq, M.A., Sepah, Y.J., Do, D. V., and Nguyen, Q.D. (2015). Management of neovascular age-related macular degeneration: Current state-of-the-art care for optimizing visual outcomes and therapies in development. *Clin. Ophthalmol.* *9*, 1001–1015.
- Allen, S.J., Watson, J.J., Shoemark, D.K., Barua, N.U., and Patel, N.K. (2013). GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol. Ther.* *138*, 155–175.
- Anderson, D.H., Ozaki, S., Nealon, M., Neitz, J., Mullins, R.F., Hageman, G.S., and Johnson, L. V (2001). Local cellular sources of apolipoprotein E in the human retina and retinal pigmented epithelium: Implications for the process of drusen formation. *Am. J. Ophthalmol.* *131*, 767–781.
- Anderson, D.H., Radeke, M.J., Gallo, N.B., Chapin, E.A., Johnson, P.T., Curletti, C.R., Hancox, L.S., Hu, J., Ebright, J.N., Malek, G., et al. (2010). The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: Hypothesis re-visited. *Prog. Retin. Eye Res.* *29*, 95–112.
- Andriessen, E.M., Wilson, A.M., Mawambo, G., Dejda, A., Miloudi, K., Sennlaub, F., and Sapiéha, P. (2016). Gut microbiota influences pathological angiogenesis in obesity-driven choroidal neovascularization. *EMBO Mol. Med.* *8*, 1366–1379.
- Annunziato, L., Amoroso, S., Pannaccione, A., Cataldi, M., Pignataro, G., D'Alessio, A., Sirabella, R., Secondo, A., Sibaud, L., and Di Renzo, G.F. (2003). Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: Role played by caspases and intracellular calcium ions. In *Toxicology Letters*, pp. 125–133.
- Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P., and Amara, S.G. (1997). Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 4155–4160.
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science (80-.)*. *317*, 666–670.
- Azadkhan, A., Truelove, S., and Aronson, J. (1982). The disposition and metabolism of sulphasalazine (salicylazosulphapyridine) in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* *13*, 523–528.

- Bailey, T.A., Kanuga, N., Romero, I.A., Greenwood, J., Luthert, P.J., and Cheetham, M.E. (2004). Oxidative stress affects the junctional integrity of retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *45*, 675–684.
- Baka, S., Clamp, A.R., and Jayson, G.C. (2006). A review of the latest clinical compounds to inhibit VEGF in pathological angiogenesis. *Expert Opin. Ther. Targets* *10*, 867–876.
- Baker, D.A., McFarland, K., Lake, R.W., Shen, H., Tang, X.C., Toda, S., and Kalivas, P.W. (2003). Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. *Nat. Neurosci.* *6*, 743–749.
- Balasubramanian, R., and Gan, L. (2014). Development of Retinal Amacrine Cells and Their Dendritic Stratification. *Curr. Ophthalmol. Rep.* *2*, 100–106.
- Bamforth, S.D., Lightman, S., and Greenwood, J. (1996). The effect of TNF-alpha and IL-6 on the permeability of the rat blood-retinal barrier in vivo. *Acta Neuropathol.* *91*, 624–632.
- Ban, Y., and Rizzolo, L.J. (2000). Differential regulation of tight junction permeability during development of the retinal pigment epithelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *279*, C744–C750.
- Bannai, S. (1986). Exchange of cystine and glutamate across plasma membrane of human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *261*, 2256–2263.
- Barde, Y.A., Edgar, D., and Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* *1*, 549–553.
- Barnett, N.L., Pow, D. V, and Bull, N.D. (2001). Differential perturbation of neuronal and glial glutamate transport systems in retinal ischaemia. *Neurochem. Int.* *39*, 291–299.
- Baskys, A., Bayazitov, I., Fang, L., Blaabjerg, M., Poulsen, F.R., and Zimmer, J. (2005). Group I metabotropic glutamate receptors reduce excitotoxic injury and may facilitate neurogenesis. *Neuropharmacology* *49*, 146–156.
- Bassi, M.T., Gasol, E., Manzoni, M., Pineda, M., Riboni, M., Martín, R., Zorzano, A., Borsani, G., and Palacín, M. (2001). Identification and characterisation of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system xc-. *Pflugers Arch.* *442*, 286–296.
- Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A., and Schall, T.J. (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* *385*, 640–642.
- Beckman, J.S. (1996). Oxidative Damage and Tyrosine Nitration from Peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* *9*, 836–844.

- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., and Freeman, B.A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *87*, 1620–1624.
- Bell, R.D., Winkler, E.A., Singh, I., Sagare, A.P., Deane, R., Wu, Z., Holtzman, D.M., Betsholtz, C., Armulik, A., Sallstrom, J., et al. (2012). Apolipoprotein e controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature* *485*, 512–516.
- Berger, A., Devenyi, R., and Héon, E. (2016). Ontario health technology assessment series: Retinal prosthesis system for advanced retinitis pigmentosa: A health technology assessment. *Ont. Health Technol. Assess. Ser.* *16*, 1–63.
- Bernstein, P.S. (2009). Nutritional interventions against age-related macular degeneration. *Acta Hort.* *841*, 103–111.
- Berson, E.L. (1993). A Randomized Trial of Vitamin A and Vitamin E Supplementation for Retinitis Pigmentosa. *Arch. Ophthalmol.* *111*, 761.
- Bertelsen, M., Jensen, H., Bregnhøj, J.F., and Rosenberg, T. (2014). Prevalence of generalized retinal dystrophy in Denmark. *Ophthalmic Epidemiol* *21*, 217–223.
- Biarnés, M., Monés, J., Alonso, J., and Arias, L. (2011). Update on geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Optom. Vis. Sci.* *88*, 881–889.
- Bird, A.C., Bressler, N.M., Bressler, S.B., Chisholm, I.H., Coscas, G., Davis, M.D., de Jong, P.T.V.M., Klaver, C.C.W., Klein, B.E.K., Klein, R., et al. (1995). An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* *39*, 367–374.
- Bird, A.C., Phillips, R.L., and Hageman, G.S. (2014). Geographic atrophy: A histopathological assessment. *JAMA Ophthalmol.* *132*, 338–345.
- Blanks, J., Reif-Lehrer, L., and Casper, D. (1981). Effects of monosodium glutamate on the isolated retina of the chick embryo as a function of age: a morphological study. *Exp Eye Res* *32*, 105–124.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A.E., Datta, S.R., Takasu, M.A., and Greenberg, M.E. (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* (80-.). *286*, 1358–1362.
- Boulton, M., and Dayhaw-Barker, P. (2001). The role of the retinal pigment epithelium: Topographical variation and ageing changes. *Eye* *15*, 384–389.
- Boven, L.A., Middel, J., Verhoef, J., De Groot, C.J.A., and Nottet, H.S.L.M. (2000). Monocyte infiltration is highly associated with loss of the tight junction protein zonula occludens in HIV-1-associated dementia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *26*, 356–360.

- Bradbury, M. (1979). Why a blood-brain barrier? *Trends Neurosci.* 2, 36–38.
- Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R., and Snyder, S.H. (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351, 714–718.
- Brennan, A.M., Won Suh, S., Joon Won, S., Narasimhan, P., Kauppinen, T.M., Lee, H., Edling, Y., Chan, P.H., and Swanson, R.A. (2009). NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat. Neurosci.* 12, 857–863.
- Bressler, N.M., and Treatment of Age-Related Macular Degeneration with Photodynamic Therapy (TAP) Study Group (2001). Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: two-year results of 2 randomized clinical trials-tap report 2. *Arch. Ophthalmol.* (Chicago, Ill. 1960) 119, 198–207.
- Bressler, N.M., Beck, R.W., and Ferris, F.L. (2011). Panretinal Photocoagulation for Proliferative Diabetic Retinopathy. *N. Engl. J. Med.* 365, 1520–1526.
- Brough, D., and Rothwell, N.J. (2007). Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. *J. Cell Sci.* 120, 772–781.
- Brown, J.C., Goldstein, J.E., Chan, T.L., Massof, R., and Ramulu, P. (2014). Characterizing functional complaints in patients seeking outpatient low-vision services in the United States. *Ophthalmology* 121, 1655–62.e1.
- Bruban, J., Maoui, A., Chalour, N., An, N., Jonet, L., Feumi, C., Tréton, J., Sennlaub, F., Behar-Cohen, F., Mascarelli, F., et al. (2011). CCR2/CCL2-mediated inflammation protects photoreceptor cells from amyloid- β -induced apoptosis. *Neurobiol. Dis.* 42, 55–72.
- Bruunsgaard, H., Skinhøj, P., Pedersen, A.N., Schroll, M., and Pedersen, B.K. (2000). Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and atherosclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* 121, 255–260.
- Bull, N.D., and Barnett, N.L. (2002). Antagonists of protein kinase C inhibit rat retinal glutamate transport activity in situ. *J. Neurochem.* 81, 472–480.
- Burdo, J., Dargusch, R., and Schubert, D. (2006). Distribution of the cystine/glutamate antiporter system xc⁻ in the brain, kidney, and duodenum. *J. Histochem. Cytochem.* 54, 549–557.
- Calippe, B., Augustin, S., Beguier, F., Charles-Messance, H., Poupel, L., Conart, J.-B., Hu, S.J., Lavalette, S., Fauvet, A., Rayes, J., et al. (2017). Complement Factor H Inhibits CD47-Mediated Resolution of Inflammation. *Immunity* 46.
- Cano, M., Thimmalappula, R., Fujihara, M., Nagai, N., Sporn, M., Wang, A.L., Neufeld, A.H., Biswal, S., and Handa, J.T. (2010). Cigarette smoking, oxidative stress, the anti-oxidant response through Nrf2 signaling, and Age-related Macular Degeneration. *Vision Res.* 50, 652–664.

- Cardona, A.E., Pioro, E.P., Sasse, M.E., Kostenko, V., Cardona, S.M., Dijkstra, I.M., Huang, D.R., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., et al. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat. Neurosci.* *9*, 917–924.
- Cayouette, M., Behn, D., Sendtner, M., Lachapelle, P., and Gravel, C. (1998). Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor prevents death and increases responsiveness of rod photoreceptors in the retinal degeneration slow mouse. *J. Neurosci.* *18*, 9282–9293.
- Cayrol, C., and Girard, J.-P. (2009). The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 9021–9026.
- Chakravarthy, U., Augood, C., Bentham, G.C., de Jong, P.T.V.M., Rahu, M., Seland, J., Soubrane, G., Tomazzoli, L., Topouzis, F., Vingerling, J.R., et al. (2007). Cigarette Smoking and Age-Related Macular Degeneration in the EUREYE Study. *Ophthalmology* *114*, 1157–1163.
- Chakravarthy, U., Wong, T.Y., Fletcher, A., Piau, E., Evans, C., Zlateva, G., Buggage, R., Pleil, A., and Mitchell, P. (2010). Clinical risk factors for age-related macular degeneration: A systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol.* *10*, 31.
- Chao, C.C., Hu, S., Ehrlich, L., and Peterson, P.K. (1995). Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain. Behav. Immun.* *9*, 355–365.
- Chen, C., Chen, H., Xu, C., Zhong, Y., and Shen, X. (2014). Role of interleukin-1 β in hypoxia-induced depression of glutamate uptake in retinal Müller cells. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* *252*, 51–58.
- Chen, H., Liu, B., Lukas, T.J., and Neufeld, A.H. (2008). The aged retinal pigment epithelium/choroid: A potential substratum for the pathogenesis of age-related macular degeneration. *PLoS One* *3*, e2339.
- Chen, M., Rajapakse, D., Fraczek, M., Luo, C., Forrester, J. V, and Xu, H. (2016). Retinal pigment epithelial cell multinucleation in the aging eye - a mechanism to repair damage and maintain homeostasis. *Aging Cell* *15*, 436–445.
- Chen, Q., Surmeier, D.J., and Reiner, A. (1999). NMDA and non-NMDA receptor-mediated excitotoxicity are potentiated in cultured striatal neurons by prior chronic depolarization. *Exp. Neurol.* *159*, 283–296.
- Chittajallu, R., Vignes, M., Dev, K.K., Barnes, J.M., Collingridge, G.L., and Henley, J.M. (1996). Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature* *379*, 78–81.
- Choi, D. (1998). Antagonizing excitotoxicity: a therapeutic strategy for stroke? *Mt Sinai J Med* *65*, 133–138.

- Choi, D.W., Maulucci-Gedde, M., and Kriegstein, A.R. (1987). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* *7*, 357–368.
- Chow, J.C., Young, D.W., Golenbock, D.T., Christ, W.J., and Gusovsky, F. (1999). Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* *274*, 10689–10692.
- Chuluundorj, D., Harding, S.A., Abernethy, D., and La Flamme, A.C. (2014). Expansion and preferential activation of the CD14⁺ CD16⁺ monocyte subset during multiple sclerosis. *Immunol. Cell Biol.* *92*, 509–517.
- Chung, W.J., Lyons, S.A., Nelson, G.M., Hamza, H., Gladson, C.L., Gillepsie, G.Y., and Sontheimer, H. (2005). Inhibition of Cystine Uptake Disrupts the Growth of Primary Brain Tumors. *J. Neurosci.* *25*, 7101–7110.
- Cipriani, R., Chara, J.C., Rodríguez-Antigüedad, A., and Matute, C. (2015). FTY720 attenuates excitotoxicity and neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* *12*, 86.
- Colwell, C.S., and Levine, M.S. (1999). Metabotropic glutamate receptor modulation of excitotoxicity in the neostriatum: role of calcium channels. *Brain Res.* *833*, 234–241.
- Combadière, C., Feumi, C., Raoul, W., Keller, N., Rodéro, M., Pézard, A., Lavalette, S., Houssier, M., Jonet, L., Picard, E., et al. (2007). CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J. Clin. Invest.* *117*, 2920–2928.
- Conradt, M., and Stoffel, W. (1997). Inhibition of the high-affinity brain glutamate transporter GLAST-1 via direct phosphorylation. *J. Neurochem.* *68*, 1244–1251.
- Cooper, A.J., and Kristal, B.S. (1997). Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol. Chem.* *378*, 793–802.
- Cousins, S.W., Espinosa-Heidmann, D.G., and Csaky, K.G. (2004). Monocyte activation in patients with age-related macular degeneration: A biomarker of risk for choroidal neovascularization? *Arch. Ophthalmol.* *122*, 1013–1018.
- Coyle, J.T., and Schwarcz, R. (1976). Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature* *263*, 244–246.
- Cruz-Guilloty, F., Saeed, A.M., Echegaray, J.J., Duffort, S., Ballmick, A., Tan, Y., Betancourt, M., Viteri, E., Ramkhellawan, G.C., Ewald, E., et al. (2013). Infiltration of proinflammatory M1 macrophages into the outer retina precedes damage in a mouse model of age-related macular degeneration. *Int. J. Inflamm.* *2013*, 1–12.
- Cull-Candy, S.G., and Leszkiewicz, D.N. (2004). Role of Distinct NMDA Receptor Subtypes at Central Synapses. *Sci. Signal.* *2004*, re16-re16.

- Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J., and Diehl, J.A. (2003). Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. *Mol. Cell Biol.* *23*, 7198–7209.
- Curcio, C.A. (2001). Photoreceptor topography in ageing and age-related maculopathy. *Eye (Lond)*. *15*, 376–383.
- Curcio, C.A., and Millican, C.L. (1999). Basal linear deposit and large drusen are specific for early age-related maculopathy. *Arch. Ophthalmol.* *117*, 329–339.
- Curcio, C.A., Millican, C.L., Bailey, T., and Kruth, H.S. (2001). Accumulation of cholesterol with age in human Bruch's membrane. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* *42*, 265–274.
- Damani, M.R., Zhao, L., Fontainhas, A.M., Amaral, J., Fariss, R.N., and Wong, W.T. (2011). Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia. *Aging Cell* *10*, 263–276.
- Van Damme, P., Van Den Bosch, L., Van Houtte, E., Eggermont, J., Callewaert, G., and Robberecht, W. (2002). Na(+) entry through AMPA receptors results in voltage-gated k(+) channel blockade in cultured rat spinal cord motoneurons. *J. Neurophysiol.* *88*, 965–972.
- Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell Death: Critical Control Points. *Cell* *116*, 205–219.
- Datta, S., Cano, M., Ebrahimi, K., Wang, L., and Handa, J.T. (2017). The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Prog. Retin. Eye Res.* *60*, 201–218.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V, Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* *8*, 752–758.
- Davis, E.J., Foster, T.D., and Thomas, W.E. (1994). Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res. Bull.* *34*, 73–78.
- Delyfer, M.-N., Forster, V., Neveux, N., Picaud, S., Léveillard, T., and Sahel, J.-A. (2005). Evidence for glutamate-mediated excitotoxic mechanisms during photoreceptor degeneration in the rd1 mouse retina. *Mol. Vis.* *11*, 688–696.
- Dinarello, C.A. (1994). Interleukin-1 in Disease. *Keio J. Med.* *43*, 131–136.
- DiScipio, R.G., Daffern, P.J., Schraufstatter, I.U., and Sriramarao, P. (1998). Human polymorphonuclear leukocytes adhere to complement factor H through an interaction that involves alphaMbeta2 (CD11b/CD18). *J. Immunol.* *160*, 4057–4066.
- Doherty, A.J., Collingridge, G.L., and Jane, D.E. (1999). Antagonist activity of alpha-substituted 4-carboxyphenylglycine analogues at group I metabotropic glutamate receptors expressed in CHO cells. *Br. J. Pharmacol.* *126*, 205–210.

- Domercq, M., Sanchez-Gomez, M. V., Sherwin, C., Etxebarria, E., Fern, R., and Matute, C. (2007). System xc- and Glutamate Transporter Inhibition Mediates Microglial Toxicity to Oligodendrocytes. *J. Immunol.* *178*, 6549–6556.
- Dornonville de la Cour, M. (1993). Ion transport in the retinal pigment epithelium. A study with double barrelled ion-selective microelectrodes. *Acta Ophthalmol. Suppl. (Oxf.)*. 1–32.
- Dostert, C., Pétrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B.T., and Tschopp, J. (2008). Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science (80-)*. *320*, 674–677.
- Doyle, S.L., Campbell, M., Ozaki, E., Salomon, R.G., Mori, A., Kenna, P.F., Farrar, G.J., Kiang, A.S., Humphries, M.M., Lavelle, E.C., et al. (2012). NLRP3 has a protective role in age-related macular degeneration through the induction of IL-18 by drusen components. *Nat. Med.* *18*, 791–798.
- Dringen, R., and Hirrlinger, J. (2003). Glutathione pathways in the brain. *Biol. Chem.* *384*, 505–516.
- Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* *82*, 47–95.
- Dugan, L.L., Sensi, S.L., Canzoniero, L.M., Handran, S.D., Rothman, S.M., Lin, T.S., Goldberg, M.P., and Choi, D.W. (1995). Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species in Cortical Neurons Following Exposure to N-methyl-D-Aspartate. *J. Neurosci.* *15*, 6377–6388.
- Dun, Y., Mysona, B., Van Ells, T., Amarnath, L., Shamsul Ola, M., Ganapathy, V., and Smith, S.B. (2006). Expression of the cystine-glutamate exchanger (xc-) in retinal ganglion cells and regulation by nitric oxide and oxidative stress. *Cell Tissue Res.* *324*, 189–202.
- Eandi, C.M., Messance, H.C., Augustin, S., Dominguez, E., Lavalette, S., Forster, V., Hu, S.J., Siquieros, L., Craft, C.M., Sahel, J.A., et al. (2016). Subretinal mononuclear phagocytes induce cone segment loss via IL-1 β . *Elife* *5*.
- Edwards, A.O., Ritter, R., Abel, K.J., Manning, A., Panhuysen, C., and Farrer, L.A. (2005). Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science (80-)*. *308*, 421–424.
- Eldadah, B.A., and Faden, A.I. (2000). Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J. Neurotrauma* *17*, 811–829.
- Eliasof, S., Arriza, J.L., Leighton, B.H., Kavanaugh, M.P., and Amara, S.G. (1998). Excitatory amino acid transporters of the salamander retina: identification, localization, and function. *J. Neurosci.* *18*, 698–712.

- Epelman, S., Lavine, K.J., Beaudin, A.E., Sojka, D.K., Carrero, J.A., Calderon, B., Brija, T., Gautier, E.L., Ivanov, S., Satpathy, A.T., et al. (2014). Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* 40, 91–104.
- Estevez, A.G., Spear, N., Manuel, S.M., Barbeito, L., Radi, R., and Beckman, J.S. (1998). Role of endogenous nitric oxide and peroxynitrite formation in the survival and death of motor neurons in culture. *Prog. Brain Res.* 118, 269–280.
- Ezekowitz, R.A., Sim, R.B., Hill, M., and Gordon, S. (1984). Local opsonization by secreted macrophage complement components. Role of receptors for complement in uptake of zymosan. *J. Exp. Med.* 159, 244–260.
- Ferkany, J.W., Zaczek, R., and Coyle, J.T. (1982). Kainic acid stimulates excitatory amino acid neurotransmitter release at presynaptic receptors. *Nature* 298, 757–759.
- Fine, S.M., Angel, R.A., Perry, S.W., Epstein, L.G., Rothstein, J.D., Dewhurst, S., and Gelbard, H.A. (1996). Tumor necrosis factor alpha inhibits glutamate uptake by primary human astrocytes. Implications for pathogenesis of HIV-1 dementia. *J. Biol. Chem.* 271, 15303–15306.
- Finnemann, S.C. (2003). Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors. *EMBO J.* 22, 4143–4154.
- Fleckenstein, M., Schmitz-Valckenberg, S., Adrion, C., Krämer, I., Eter, N., Helb, H.M., Brinkmann, C.K., Issa, P.C., Mansmann, U., and Holz, F.G. (2010). Tracking progression with spectral-domain optical coherence tomography in geographic atrophy caused by age-related macular degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 3846–3852.
- Fletcher, A.E., Bentham, G.C., Agnew, M., Young, I.S., Augood, C., Chakravarthy, U., De Jong, P.T.V.M., Rahu, M., Seland, J., Soubrane, G., et al. (2008). Sunlight exposure, antioxidants, and age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 126, 1396–1403.
- Fletcher, E.L., Hack, I., Brandstätter, J.H., and Wässle, H. (2000). Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. *J. Comp. Neurol.* 420, 98–112.
- Fogal, B., Li, J., Lobner, D., McCullough, L.D., and Hewett, S.J. (2007). System xc Activity and Astrocytes Are Necessary for Interleukin-1 -Mediated Hypoxic Neuronal Injury. *J. Neurosci.* 27, 10094–10105.
- Fontaine, V., Kinkl, N., Sahel, J., Dreyfus, H., and Hicks, D. (1998). Survival of purified rat photoreceptors in vitro is stimulated directly by fibroblast growth factor-2. *J. Neurosci.* 18, 9662–9672.
- Fontainhas, A.M., Wang, M., Liang, K.J., Chen, S., Mettu, P., Damani, M., Fariss, R.N., Li, W., and Wong, W.T. (2011). Microglial morphology and dynamic behavior is regulated by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *PLoS One* 6, e15973.

Frade, J.M., Rodriguez-Tebar, A., and Barde, Y.A. (1996). Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 383, 166–168.

Francke, M., Faude, F., Pannicke, T., Bringmann, A., Eckstein, P., Reichelt, W., Wiedemann, P., and Reichenbach, A. (2001). Electrophysiology of rabbit Müller (glial) cells in experimental retinal detachment and PVR. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1072–1079.

Frasson, M., Picaud, S., Léveillard, T., Simonutti, M., Mohand-Said, S., Dreyfus, H., Hicks, D., and Sahel, J. (1999). Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 2724–2734.

Friedman, D.S., O’Colmain, B.J., Muñoz, B., Tomany, S.C., McCarty, C., DeJong, P.T.V.M., Nemesure, B., Mitchell, P., Kempner, J., and Congdon, N. (2004). Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in the United States. *Arch. Ophthalmol.* 122, 564–572.

Fritsche, L.G., Chen, W., Schu, M., Yaspan, B.L., Yu, Y., Thorleifsson, G., Zack, D.J., Arakawa, S., Cipriani, V., Ripke, S., et al. (2013). Seven new loci associated with age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* 45, 433–439.

Fritsche, L.G., Fariss, R.N., Stambolian, D., Abecasis, G.R., Curcio, C.A., and Swaroop, A. (2014). Age-Related Macular Degeneration: Genetics and Biology Coming Together. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 15, 151–171.

Fritsche, L.G., Igl, W., Bailey, J.N.C., Grassmann, F., Sengupta, S., Bragg-Gresham, J.L., Burdon, K.P., Hebbring, S.J., Wen, C., Gorski, M., et al. (2015). A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nat. Genet.* 48, 134–143.

Fukui, M., Song, J.H., Choi, J., Choi, H.J., and Zhu, B.T. (2009). Mechanism of glutamate-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. *Eur. J. Pharmacol.* 617, 1–11.

van Furth, R. (1976). Origin and Kinetics of Mononuclear Phagocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 278, 161–175.

Gal, A., Li, Y., Thompson, D.A., Weir, J., Orth, U., Jacobson, S.G., Apfelstedt-Sylla, E., and Vollrath, D. (2000). Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 26, 270–271.

Garlanda, C., Dinarello, C.A., and Mantovani, A. (2013). The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity* 39, 1003–1018.

Gautier, E.L., and Yvan-Charvet, L. (2014). Understanding macrophage diversity at the ontogenic and transcriptomic levels. *Immunol. Rev.* 262, 85–95.

Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71–82.

Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* (80-.). 327, 656–661.

- Gerhardinger, C., Costa, M.B., Coulombe, M.C., Toth, I., Hoehn, T., and Grosu, P. (2005). Expression of acute-phase response proteins in retinal Müller cells in diabetes. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* *46*, 349–357.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010a). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* (80-). *330*, 841–845.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010b). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* (80-). *330*, 841–845.
- Gout, P.W., Buckley, A.R., Simms, C.R., and Bruchovsky, N. (2001). Sulfasalazine, a potent suppressor of lymphoma growth by inhibition of the x- c cystine transporter: A new action for an old drug. *Leukemia* *15*, 1633–1640.
- Greger, I.H., Khatri, L., and Ziff, E.B. (2002). RNA editing at Arg607 controls AMPA receptor exit from the endoplasmic reticulum. *Neuron* *34*, 759–772.
- Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R., and Ferguson, T.A. (1995). Fas Ligand-Induced Apoptosis as a Mechanism of Immune Privilege. *Science* (80-). *270*, 1189–1192.
- Grishanin, R.N., Yang, H., Liu, X., Donohue-Rolfe, K., Nune, G.C., Zang, K., Xu, B., Duncan, J.L., LaVail, M.M., Copenhagen, D.R., et al. (2008). Retinal TrkB receptors regulate neural development in the inner, but not outer, retina. *Mol. Cell. Neurosci.* *38*, 431–443.
- Grunewald, M., and Kanner, B.I. (2000). The accessibility of a novel reentrant loop of the glutamate transporter GLT-1 is restricted by its substrate. *J. Biol. Chem.* *275*, 9684–9689.
- Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J. Exp. Med.* *210*, 1977–1992.
- Guo, C., Otani, A., Oishi, A., Kojima, H., Makiyama, Y., Nakagawa, S., and Yoshimura, N. (2012). Knockout of *ccr2* alleviates photoreceptor cell death in a model of retinitis pigmentosa. *Exp. Eye Res.* *104*, 39–47.
- Gupta, N., Brown, K.E., and Milam, A.H. (2003). Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* *76*, 463–471.
- Hageman, G.S., Anderson, D.H., Johnson, L. V., Hancox, L.S., Taiber, A.J., Hardisty, L.I., Hageman, J.L., Stockman, H.A., Borchardt, J.D., Gehrs, K.M., et al. (2005). A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 7227–7232.

- Haller, J.A. (2013). Current anti-vascular endothelial growth factor dosing regimens: Benefits and burden. *Ophthalmology* 120, S3–S7.
- Ham, W.T., Ruffolo, J.J., Mueller, H.A., Clarke, A.M., and Moon, M.E. (1978). Histologic analysis of photochemical lesions produced in rhesus retina by short-wavelength light. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 17, 1029–1035.
- Hamann, S. (2002). Molecular mechanisms of water transport in the eye. *Int. Rev. Cytol.* 215, 395–431.
- Hamel, C. (2006). Retinitis pigmentosa. *Orphanet J. Rare Dis.* 1, 40.
- Harada, C., Harada, T., Quah, H.M.A., Maekawa, F., Yoshida, K., Ohno, S., Wada, K., Parada, L.F., and Tanaka, K. (2003). Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Müller glial cells during light-induced retinal degeneration. *Neuroscience* 122, 229–235.
- Harada, C., Azuchi, Y., Noro, T., Guo, X., Kimura, A., Namekata, K., and Harada, T. (2015). TrkB signaling in retinal glia stimulates neuroprotection after optic nerve injury. *Am. J. Pathol.* 185, 3238–3247.
- Harada, T., Harada, C., Watanabe, M., Inoue, Y., Sakagawa, T., Nakayama, N., Sasaki, S., Okuyama, S., Watase, K., Wada, K., et al. (1998). Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 4663–4666.
- Harada, T., Harada, C., Kohsaka, S., Wada, E., Yoshida, K., Ohno, S., Mamada, H., Tanaka, K., Parada, L.F., and Wada, K. (2002). Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J. Neurosci.* 22, 9228–9236.
- Harrison, J.K., Jiang, Y., Chen, S., Xia, Y., Maciejewski, D., McNamara, R.K., Streit, W.J., Salafranca, M.N., Adhikari, S., Thompson, D.A., et al. (1998). Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 10896–10901.
- Hartveit, E. (1997). Functional organization of cone bipolar cells in the rat retina. *J. Neurophysiol.* 77 VN-r, 1716–1730.
- Harvey, D.M., and Calkins, D.J. (2002). Localization of kainate receptors to the presynaptic active zone of the rod photoreceptor in primate retina. *Vis. Neurosci.* 19, 681–692.
- Hauck, S.M., Kinkl, N., Deeg, C.A., Swiatek-de Lange, M., Schöffmann, S., and Ueffing, M. (2006). GDNF family ligands trigger indirect neuroprotective signaling in retinal glial cells. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2746–2757.
- Haumann, I., Junghans, D., Anstötz, M., and Frotscher, M. (2017). Presynaptic localization of GluK5 in rod photoreceptors suggests a novel function of high affinity glutamate receptors in the mammalian retina. *PLoS One* 12, e0172967.

- He, Y., Jackman, N.A., Thorn, T.L., Vought, V.E., and Hewett, S.J. (2015). Interleukin-1 β protects astrocytes against oxidant-induced injury via an NF- κ B-Dependent upregulation of glutathione synthesis. *Glia* 63, 1568–1580.
- Hearps, A.C., Martin, G.E., Angelovich, T.A., Cheng, W.J., Maisa, A., Landay, A.L., Jaworowski, A., and Crowe, S.M. (2012). Aging is associated with chronic innate immune activation and dysregulation of monocyte phenotype and function. *Aging Cell* 11, 867–875.
- Helton, T.D., Otsuka, T., Lee, M.-C., Mu, Y., and Ehlers, M.D. (2008). Pruning and loss of excitatory synapses by the parkin ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 19492–19497.
- Henley, J.M., and Wilkinson, K.A. (2016). Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 337–350.
- Hensley, K., Robinson, K.A., Gabbita, S.P., Salsman, S., and Floyd, R.A. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1456–1462.
- Higgins, G.C., Beart, P.M., and Nagley, P. (2009). Oxidative stress triggers neuronal caspase-independent death: Endonuclease G involvement in programmed cell death-type III. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 2773–2787.
- Hitzler, I., Sayi, A., Kohler, E., Engler, D.B., Koch, K.N., Hardt, W.-D., and Muller, A. (2012). Caspase-1 Has Both Proinflammatory and Regulatory Properties in Helicobacter Infections, Which Are Differentially Mediated by Its Substrates IL-1 and IL-18. *J. Immunol.* 188, 3594–3602.
- Holmin, S., and Mathiesen, T. (2000). Intracerebral administration of interleukin-1 β and induction of inflammation, apoptosis, and vasogenic edema. *J. Neurosurg.* 92, 108–120.
- Holz, F.G., Strauss, E.C., Schmitz-Valckenberg, S., and Van Lookeren Campagne, M. (2014). Geographic atrophy: Clinical features and potential therapeutic approaches. *Ophthalmology* 121, 1079–1091.
- Hotamisligil, G., Shargill, N., and Spiegelman, B. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* (80-.). 259, 87–91.
- Housset, M., and Sennlaub, F. (2015). Thrombospondin-1 and Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 31, 1–7.
- Housset, M., Samuel, A., Ettaiche, M., Bemelmans, A., Beby, F., Billon, N., and Lamonerie, T. (2013). Loss of Otx2 in the Adult Retina Disrupts Retinal Pigment Epithelium Function, Causing Photoreceptor Degeneration. *J. Neurosci.* 33, 9890–9904.
- Hu, R.G., Lim, J., Donaldson, P.J., and Kalloniatis, M. (2008). Characterization of the cystine/glutamate transporter in the outer plexiform layer of the vertebrate retina. *Eur. J. Neurosci.* 28, 1491–1502.

- Hu, S.J., Calippe, B., Lavalette, S., Roubex, C., Montassar, F., Housset, M., Levy, O., Delarasse, C., Paques, M., Sahel, J.A., et al. (2015). Upregulation of P2RX7 in Cx3cr1-deficient mononuclear phagocytes leads to increased interleukin-1 β secretion and photoreceptor neurodegeneration. *J. Neurosci.* *35*, 6987–6996.
- Huang, Y., Smith, D.E., Ibanez-Sandoval, O., Sims, J.E., and Friedman, W.J. (2011). Neuron-Specific Effects of Interleukin-1 Are Mediated by a Novel Isoform of the IL-1 Receptor Accessory Protein. *J. Neurosci.* *31*, 18048–18059.
- Hunter, M.I., Nlemadim, B.C., and Davidson, D.L. (1985). Lipid peroxidation products and antioxidant proteins in plasma and cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Neurochem. Res.* *10*, 1645–1652.
- Iglesias, R., Dahl, G., Qiu, F., Spray, D.C., and Scemes, E. (2009). Pannexin 1: The Molecular Substrate of Astrocyte “Hemichannels.” *J. Neurosci.* *29*, 7092–7097.
- Iino, M., Ozawa, S., and Tsuzuki, K. (1990). Permeation of calcium through excitatory amino acid receptor channels in cultured rat hippocampal neurones. *J. Physiol.* *424*, 151–165.
- Ishibashi, T., Hata, Y., Yoshikawa, H., Sueishi, K., and Inomata, H. (1997). Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization. *Graefe’s Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* *235*, 159–167.
- Ishida, B.Y., Bailey, K.R., Duncan, K.G., Chalkley, R.J., Burlingame, A.L., Kane, J.P., and Schwartz, D.M. (2004). Regulated expression of apolipoprotein E by human retinal pigment epithelial cells. *J. Lipid Res.* *45*, 263–271.
- Ishida, K., Panjwani, N., Cao, Z., and Streilein, J.W. (2003). Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms. *Ocul. Immunol. Inflamm.* *11*, 91–105.
- Ishikawa, M. (2013). Abnormalities in Glutamate Metabolism and Excitotoxicity in the Retinal Diseases. *Scientifica (Cairo)*. *2013*, 1–13.
- Izumi-Nagai, K., Nagai, N., Ozawa, Y., Mihara, M., Ohsugi, Y., Kurihara, T., Koto, T., Satofuka, S., Inoue, M., Tsubota, K., et al. (2007). Interleukin-6 receptor-mediated activation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) promotes choroidal neovascularization. *Am. J. Pathol.* *170*, 2149–2158.
- Jablonski, M.M., Freeman, N.E., Orr, W.E., Templeton, J.P., Lu, L., Williams, R.W., and Geisert, E.E. (2011). Genetic pathways regulating glutamate levels in retinal müller cells. *Neurochem. Res.* *36*, 594–603.
- Jackman, N.A., Uliasz, T.F., Hewett, J.A., and Hewett, S.J. (2010a). Regulation of system xc⁻ activity and expression in astrocytes by interleukin-1 beta: Implications for hypoxic neuronal injury. *Glia* *58*, 1806–1815.

Jackman, N.A., Uliasz, T.F., Hewett, J.A., and Hewett, S.J. (2010b). Regulation of system xc⁻ activity and expression in astrocytes by interleukin-1 beta: Implications for hypoxic neuronal injury. *Glia* 58, 1806–1815.

Jackman, N.A., Melchior, S.E., Hewett, J.A., and Hewett, S.J. (2012a). Non-Cell Autonomous Influence of the Astrocyte System xc⁻ on Hypoglycaemic Neuronal Cell Death. *ASN Neuro* 4, AN20110030.

Jackman, N.A., Melchior, S.E., Hewett, J.A., and Hewett, S.J. (2012b). Non-Cell Autonomous Influence of the Astrocyte System xc⁻ on Hypoglycaemic Neuronal Cell Death. *ASN Neuro* 4, AN20110030.

Jager, J., Grémeaux, T., Cormont, M., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J.F. (2007). Interleukin-1 β -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* 148, 241–251.

Jakobs, T.C., Ben, Y., and Masland, R.H. (2007). Expression of mRNA for glutamate receptor subunits distinguishes the major classes of retinal neurons, but is less specific for individual cell types. *Mol. Vis.* 13, 933–948.

James A Dixon, Scott CN Oliver, Jeffrey L Olson, N.M. (2009). VEGF Trap-Eye for the treatment of neovascular age-related macular degeneration VEGF Trap-Eye for the treatment of neovascular age-related macular degeneration ut rm h r. *Expert Opin. Investig. Drugs* 18, 1573–1580.

Johnson, T. V., Bull, N.D., and Martin, K.R. (2011). Neurotrophic factor delivery as a protective treatment for glaucoma. *Exp. Eye Res.* 93, 196–203.

Ju, W.-K., Lindsey, J.D., Angert, M., Patel, A., and Weinreb, R.N. (2008). Glutamate receptor activation triggers OPA1 release and induces apoptotic cell death in ischemic rat retina. *Mol. Vis.* 14, 2629–2638.

Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., and Littman, D.R. (2000). Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4106–4114.

Kang, S.M., Schneider, D.B., Lin, Z., Hanahan, D., Dichek, D.A., Stock, P.G., and Baekkeskov, S. (1997). Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction. *Nat. Med.* 3, 738–743.

Kang, Y.H., Urban, B.C., Sim, R.B., and Kishore, U. (2012). Human complement Factor H modulates C1q-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *Immunobiology* 217, 455–464.
Kapoor, R., Davies, M., Blaker, P.A., Hall, S.M., and Smith, K.J. (2003). Blockers of sodium and calcium entry protect axons from nitric oxide-mediated degeneration. *Ann. Neurol.* 53, 174–180.

Kato, S., Ishita, S., Sugawara, K., and Mawatari, K. (1993). Cystine/glutamate antiporter expression in retinal müller glial cells: Implications for dl-alpha-amino adipate toxicity. *Neuroscience* 57, 473–482.

Kawano, Y., Nakae, J., Watanabe, N., Kikuchi, T., Tateya, S., Tamori, Y., Kaneko, M., Abe, T., Onodera, M., and Itoh, H. (2016). Colonic Pro-inflammatory Macrophages Cause Insulin Resistance in an Intestinal Ccl2/Ccr2-Dependent Manner. *Cell Metab.* *24*, 295–310.

Kiagiadaki, F., Savvaki, M., and Thermos, K. (2010). Activation of somatostatin receptor (sst5) protects the rat retina from AMPA-induced neurotoxicity. *Neuropharmacology* *58*, 297–303.

Kigerl, K.A., Ankeny, D.P., Garg, S.K., Wei, P., Guan, Z., Lai, W., McTigue, D.M., Banerjee, R., and Popovich, P.G. (2012). System x(c)⁻ regulates microglia and macrophage glutamate excitotoxicity in vivo. *Exp. Neurol.* *233*, 333–341.

Kim, Y., Tarallo, V., Kerur, N., Yasuma, T., Gelfand, B.D., Bastos-Carvalho, A., Hirano, Y., Yasuma, R., Mizutani, T., Fowler, B.J., et al. (2014). DICER1/ Alu RNA dysmetabolism induces Caspase-8-mediated cell death in age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 16082–16087.

Kirsch, M., Lee, M.Y., Meyer, V., Wiese, A., and Hofmann, H.D. (1997). Evidence for multiple, local functions of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in retinal development: expression of CNTF and its receptors and in vitro effects on target cells. *J Neurochem* *68*, 979–990.

Klaver, C.C.W., Kliffen, M., van Duijn, C.M., Hofman, A., Cruts, M., Grobbee, D.E., van Broeckhoven, C., and de Jong, P.T.V.M. (1998). Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* *63*, 200–206.

Klein, R., Klein, B.E., Tomany, S.C., Meuer, S.M., and Huang, G.H. (2002). Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: The Beaver Dam eye study. *Ophthalmology* *109*, 1767–1779.

Klein, R., Peto, T., Bird, A., and Vannewkirk, M.R. (2004). The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* *137*, 486–495.

Kobayashi, A., Kang, M.-I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., and Yamamoto, M. (2004). Oxidative Stress Sensor Keap1 Functions as an Adaptor for Cul3-Based E3 Ligase To Regulate Proteasomal Degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 7130–7139.

Koerberle, P.D., and Bähr, M. (2008). The upregulation of GLAST-1 is an indirect antiapoptotic mechanism of GDNF and neurturin in the adult CNS. *Cell Death Differ.* *15*, 471–483.

Kofuji, P., Ceelen, P., Zahs, K.R., Surbeck, L.W., Lester, H.A., and Newman, E.A. (2000). Genetic Inactivation of an Inwardly Rectifying Potassium Channel (Kir4.1 Subunit) in Mice: Phenotypic Impact in Retina. *J. Neurosci.* *20*, 5733–5740.

Koh, A., Lee, W.K., Chen, L.J., Chen, S.J., Hashad, Y., Kim, H., Lai, T.Y., Pilz, S., Ruamviboonsuk, P., Tokaji, E., et al. (2012). Everest study: Efficacy and safety of verteporfin photodynamic therapy in combination with ranibizumab or alone versus ranibizumab monotherapy in patients with symptomatic macular polypoidal choroidal vasculopathy. *Retina* 32, 1453–1464.

Köhler, M., Burnashev, N., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1993). Determinants of Ca²⁺ permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: Diversity by RNA editing. *Neuron* 10, 491–500.

Kohno, H., Chen, Y., Kevany, B.M., Pearlman, E., Miyagi, M., Maeda, T., Palczewski, K., and Maeda, A. (2013). Photoreceptor proteins initiate microglial activation via toll-like receptor 4 in retinal degeneration mediated by all-trans-retinal. *J. Biol. Chem.* 288, 15326–15341.

Konari, K., Sawada, N., Zhong, Y., Isomura, H., Nakagawa, T., and Mori, M. (1995). Development of the blood-retinal barrier in vitro: Formation of tight junctions as revealed by occludin and ZO-1 correlates with the barrier function of chick retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 61, 99–108.

Koprach, J.B., Reske-Nielsen, C., Mithal, P., and Isacson, O. (2008). Neuroinflammation mediated by IL-1 β increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *J. Neuroinflammation* 5, 8.

Lai, T.W., Zhang, S., and Wang, Y.T. (2014). Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* 115, 157–188.

Landshamer, S., Hoehn, M., Barth, N., Duvezin-Caubet, S., Schwake, G., Tobaben, S., Kazhdan, I., Becattini, B., Zahler, S., Vollmar, A., et al. (2008). Bid-induced release of AIF from mitochondria causes immediate neuronal cell death. *Cell Death Differ.* 15, 1553–1563.

Lapchak, P.A. (2010). A critical assessment of edaravone acute ischemic stroke efficacy trials: is edaravone an effective neuroprotective therapy? *Expert Opin. Pharmacother.* 11, 1753–1763.

Lauri, S.E., Vesikansa, A., Segerstråle, M., Collingridge, G.L., Isaac, J.T.R., and Taira, T. (2006). Functional Maturation of CA1 Synapses Involves Activity-Dependent Loss of Tonic Kainate Receptor-Mediated Inhibition of Glutamate Release. *Neuron* 50, 415–429.

LaVail, M.M., Unoki, K., Yasumura, D., Matthes, M.T., Yancopoulos, G.D., and Steinberg, R.H. (1992). Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 11249–11253.

Lavalette, S., Raoul, W., Houssier, M., Camelo, S., Levy, O., Calippe, B., Jonet, L., Behar-Cohen, F., Chemtob, S., Guillonneau, X., et al. (2011). Interleukin-1 β inhibition prevents choroidal neovascularization and does not exacerbate photoreceptor degeneration. *Am. J. Pathol.* 178, 2416–2423.

- Lawler, J., and Hynes, R.O. (1986). The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J. Cell Biol.* *103*, 1635–1648.
- Lechner, J., Chen, M., Hogg, R.E., Toth, L., Silvestri, G., Chakravarthy, U., and Xu, H. (2017). Peripheral blood mononuclear cells from neovascular age-related macular degeneration patients produce higher levels of chemokines CCL2 (MCP-1) and CXCL8 (IL-8). *J. Neuroinflammation* *14*, 42.
- Lees, K.R. (1998). Does neuroprotection improve stroke outcome? *Lancet* *351*, 1447–1448.
- Lees, K.R., Zivin, J.A., Ashwood, T., Davalos, A., Davis, S.M., Diener, H.-C., Grotta, J., Lyden, P., Shuaib, A., Hårdemark, H.-G., et al. (2006). NXY-059 for Acute Ischemic Stroke. *N. Engl. J. Med.* *354*, 588–600.
- Lehre, K.P., Davanger, S., and Danbolt, N.C. (1997). Localization of the glutamate transporter protein GLAST in rat retina. *Brain Res.* *744*, 129–137.
- Lerma, J., and Marques, J.M. (2013). Kainate receptors in health and disease. *Neuron* *80*, 292–311.
- Levy, O., Calippe, B., Lavalette, S., Hu, S.J., Raoul, W., Dominguez, E., Housset, M., Paques, M., Sahel, J.-A., Bemelmans, A.-P., et al. (2015a). Apolipoprotein E promotes subretinal mononuclear phagocyte survival and chronic inflammation in age-related macular degeneration. *EMBO Mol. Med.* *7*, 211–226.
- Levy, O., Lavalette, S., Hu, S.J., Housset, M., Raoul, W., Eandi, C., Sahel, J.-A., Sullivan, P.M., Guillonneau, X., and Sennlaub, F. (2015b). APOE Isoforms Control Pathogenic Subretinal Inflammation in Age-Related Macular Degeneration. *J. Neurosci.* *35*, 13568–13576.
- Lewerenz, J., Klein, M., and Methner, A. (2006a). Cooperative action of glutamate transporters and cystine/glutamate antiporter system Xc-protects from oxidative glutamate toxicity. *J. Neurochem.* *98*, 916–925.
- Lewerenz, J., Klein, M., and Methner, A. (2006b). Cooperative action of glutamate transporters and cystine/glutamate antiporter system Xc-protects from oxidative glutamate toxicity. *J. Neurochem.* *98*, 916–925.
- Li, Q., and Puro, D.G. (2002). Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Müller cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* *43*, 3109–3116.
- Li, Y., Maher, P.A., and Schubert, D.R. (1997a). A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. *Neuron* *19*, 453–463.
- Li, Y., Maher, P., and Schubert, D. (1997b). Requirement for cGMP in nerve cell death caused by glutathione depletion. *J. Cell Biol.* *139*, 1317–1324.

- Li, Y., Du, X.F., Liu, C.S., Wen, Z.L., and Du, J.L. (2012). Reciprocal Regulation between Resting Microglial Dynamics and Neuronal Activity In Vivo. *Dev. Cell* 23, 1189–1202.
- Lindblad, A.S., Lloyd, P.C., Clemons, T.E., Gensler, G.R., Ferris, F.L., Klein, M.L., and Armstrong, J.R. (2009). Change in area of geographic atrophy in the age-related eye disease study: AREDS report number 26. *Arch. Ophthalmol.* 127, 1168–1174.
- Linker, R.A., Mäurer, M., Gaupp, S., Martini, R., Holtmann, B., Giess, R., Rieckmann, P., Lassmann, H., Toyka, K. V., Sendtner, M., et al. (2002). CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: A neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat. Med.* 8, 620–624.
- Liu, S.J., and Zukin, R.S. (2007). Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends Neurosci.* 30, 126–134.
- Liu, X., Albano, R., and Lobner, D. (2014). FGF-2 induces neuronal death through upregulation of system xc⁻. *Brain Res.* 1547, 25–33.
- Liu, Y., Wong, T.P., Aarts, M., Rooyackers, A., Liu, L., Lai, T.W., Wu, D.C., Lu, J., Tymianski, M., Craig, A.M., et al. (2007). NMDA Receptor Subunits Have Differential Roles in Mediating Excitotoxic Neuronal Death Both In Vitro and In Vivo. *J. Neurosci.* 27, 2846–2857.
- Liu, Y., Costa, M., and Gerhardinger, C. (2012). IL-1 β is upregulated in the diabetic retina and retinal vessels: Cell-specific effect of high glucose and IL-1 β autostimulation. *PLoS One* 7, e36949.
- Lobner, D. (2009). Mechanisms of beta-N-methylamino-L-alanine induced neurotoxicity. *Amyotroph. Lateral Scler.* 10, 56–60.
- Lucas, D.R., and Newhouse, J.P. (1957). The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA. Arch. Ophthalmol.* 58, 193–201.
- Luo, C., Chen, M., and Xu, H. (2011). Complement gene expression and regulation in mouse retina and retinal pigment epithelium/choroid. *Mol. Vis.* 17, 1588–1597.
- MacNeil, M.A., and Masland, R.H. (1998). Extreme diversity among amacrine cells: Implications for function. *Neuron* 20, 971–982.
- Magnusson, K.P., Duan, S., Sigurdsson, H., Petursson, H., Yang, Z., Zhao, Y., Bernstein, P.S., Ge, J., Jonasson, F., Stefansson, E., et al. (2006). CFH Y402H confers similar risk of soft drusen and both forms of advanced AMD. *PLoS Med.* 3, 109–114.
- Mahley, R.W., and Rall, S.C. (2000). Apolipoprotein E: Far More Than a Lipid Transport Protein. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 1, 507–537.
- Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., and Huang, Y. (2009). Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J. Lipid Res.* 50, S183–S188.

- Manna, P.P., Dimitry, J., Oldenborg, P.A., and Frazier, W.A. (2005). CD47 augments fas/CD95-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* *280*, 29637–29644.
- Mantovani, A., Sica, A., and Locati, M. (2005). Macrophage polarization comes of age. *Immunity* *23*, 344–346.
- Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol. Cell* *10*, 417–426.
- El Mathari, B., Sene, A., Charles-Messance, H., Vacca, O., Guillonneau, X., Grepin, C., Sennlaub, F., Sahel, J.-A., Rendon, A., and Tadayoni, R. (2015). Dystrophin Dp71 gene deletion induces retinal vascular inflammation and capillary degeneration. *Hum. Mol. Genet.* *24*.
- Mathis, T., Housset, M., Eandi, C., Beguier, F., Touhami, S., Reichman, S., Augustin, S., Gondouin, P., Sahel, J.A., Kodjikian, L., et al. (2017). Activated monocytes resist elimination by retinal pigment epithelium and downregulate their OTX2 expression via TNF- α . *Aging Cell* *16*, 173–182.
- Mckay, G.J., Patterson, C.C., Chakravarthy, U., Dasari, S., Klaver, C.C., Vingerling, J.R., Ho, L., de Jong, P.T.V.M., Fletcher, A.E., Young, I.S., et al. (2011). Evidence of association of APOE with age-related macular degeneration - a pooled analysis of 15 studies. *Hum. Mutat.* *32*, 1407–1416.
- McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., and Hayes, J.D. (2003). Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J. Biol. Chem.* *278*, 21592–21600.
- Medawar, P.B. (1948). Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br. J. Exp. Pathol.* *129*, 58–69.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* *454*, 428–435.
- Menger, N., Pow, D. V, and Wassle, H. (1998). Glycinergic amacrine cells of the rat retina. *J Comp Neurol* *401*, 34–46.
- Miceli, M. V., Liles, M.R., and Newsome, D.A. (1994). Evaluation of oxidative processes in human pigment epithelial cells associated with retinal outer segment phagocytosis. *Exp. Cell Res.* *214*, 242–249.
- Micklisch, S., Lin, Y., Jacob, S., Karlstetter, M., Dannhausen, K., Dasari, P., von der Heide, M., Dahse, H.M., Schmölz, L., Grassmann, F., et al. (2017). Age-related macular degeneration associated polymorphism rs10490924 in ARMS2 results in deficiency of a complement activator. *J. Neuroinflammation* *14*, 4.

- Midena, E., Vujosevic, S., Convento, E., Manfre', A., Cavarzeran, F., and Pitotto, E. (2007). Microperimetry and fundus autofluorescence in patients with early age-related macular degeneration. *Br. J. Ophthalmol.* *91*, 1499–1503.
- Milatovic, D., Gupta, R.C., and Dettbarn, W.D. (2002). Involvement of nitric oxide in kainic acid-induced excitotoxicity in rat brain. *Brain Res.* *957*, 330–337.
- Misra, I., and Griffith, O.W. (1998). Expression and purification of human γ -glutamylcysteine synthetase. *Protein Expr. Purif.* *13*, 268–276.
- Mitamura, Y., Mitamura-Aizawa, S., Katome, T., Naito, T., Hagiwara, A., Kumagai, K., and Yamamoto, S. (2013). Photoreceptor impairment and restoration on optical coherence tomographic image. *J. Ophthalmol.* *2013*, 518170.
- Miyajima-Uchida, H., Hayashi, H., Beppu, R., Kuroki, M., Fukami, M., Arakawa, F., Tomita, Y., and Oshima, K. (2000). Production and accumulation of thrombospondin-1 in human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *41*, 561–567.
- Mizutani, M., Gerhardinger, C., and Lorenzi, M. (1998). Müller cell changes in human diabetic retinopathy. *Diabetes* *47*, 445–449.
- Mizutani, M., Pino, P.A., Saederup, N., Charo, I.F., Ransohoff, R.M., and Cardona, A.E. (2012). The Fractalkine Receptor but Not CCR2 Is Present on Microglia from Embryonic Development throughout Adulthood. *J. Immunol.* *188*, 29–36.
- Moniuszko, M., Bodzenta-Lukaszyk, A., Kowal, K., Lenczewska, D., and Dabrowska, M. (2009). Enhanced frequencies of CD14⁺⁺CD16⁺, but not CD14⁺CD16⁺, peripheral blood monocytes in severe asthmatic patients. *Clin. Immunol.* *130*, 338–346.
- Morcos, Y., Hosie, M.J., Bauer, H.C., and Chan-Ling, T. (2001). Immunolocalization of occludin and claudin-1 to tight junctions in intact CNS vessels of mammalian retina. *J. Neurocytol.* *30*, 107–123.
- Moreno, M.C., Sande, P., Marcos, H.A., de Zavalía, N., Keller Sarmiento, M.I., and Rosenstein, R.E. (2005). Effect of glaucoma on the retinal glutamate/glutamine cycle activity. *FASEB J.* *19*, 1161–1162.
- Murphy, T.H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R.L., and Coyle, J.T. (1989a). Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* *2*, 1547–1558.
- Murphy, T.H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R.L., and Coyle, J.T. (1989b). Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* *2*, 1547–1558.
- Mysona, B., Dun, Y., Duplantier, J., Ganapathy, V., and Smith, S.B. (2009). Effects of hyperglycemia and oxidative stress on the glutamate transporters GLAST and system xc⁻ in mouse retinal Müller glial cells. *Cell Tissue Res.* *335*, 477–488.

- Nagelhus, E.A., Veruki, M.L., Torp, R., Haug, F.M., Laake, J.H., Nielsen, S., Agre, P., and Ottersen, O.P. (1998). Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Müller cells and fibrous astrocytes. *J. Neurosci.* *18*, 2506–2519.
- Nagelhus, E.A., Horio, Y., Inanobe, A., Fujita, A., Haug, F.M., Nielsen, S., Kuhachi, Y., and Ottersen, O.P. (1999). Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* *26*, 47–54.
- Nakazawa, T., Hisatomi, T., Nakazawa, C., Noda, K., Maruyama, K., She, H., Matsubara, A., Miyahara, S., Nakao, S., Yin, Y., et al. (2007). Monocyte chemoattractant protein 1 mediates retinal detachment-induced photoreceptor apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 2425–2430.
- Namekata, K., Harada, C., Kohyama, K., Matsumoto, Y., and Harada, T. (2008). Interleukin-1 Stimulates Glutamate Uptake in Glial Cells by Accelerating Membrane Trafficking of Na⁺/K⁺-ATPase via Actin Depolymerization. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 3273–3280.
- Namekata, K., Harada, C., Guo, X., Kikushima, K., Kimura, A., Fuse, N., Mitamura, Y., Kohyama, K., Matsumoto, Y., Tanaka, K., et al. (2009). Interleukin-1 attenuates normal tension glaucoma-like retinal degeneration in EAAC1-deficient mice. *Neurosci. Lett.* *465*, 160–164.
- Napper, G.A., Pianta, M.J., and Kalloniatis, M. (1999). Reduced glutamate uptake by retinal glial cells under ischemic/hypoxic conditions. *Vis. Neurosci.* *16*, 149–158.
- Narimatsu, T., Ozawa, Y., Miyake, S., Kubota, S., Hirasawa, M., Nagai, N., Shimmura, S., and Tsubota, K. (2013). Disruption of cell-cell junctions and induction of pathological cytokines in the retinal pigment epithelium of light-exposed mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* *54*, 4555–4562.
- Neitemeier, S., Dolga, A.M., Honrath, B., Karuppagounder, S.S., Alim, I., Ratan, R.R., and Culmsee, C. (2016). Inhibition of HIF-prolyl-4-hydroxylases prevents mitochondrial impairment and cell death in a model of neuronal oxytosis. *Cell Death Dis.* *7*, e2214–e2214.
- Netea, M.G., Nold-Petry, C.A., Nold, M.F., Joosten, L.A.B., Opitz, B., Van Der Meer, J.H.M., Van De Veerdonk, F.L., Ferwerda, G., Heinhuis, B., Devesa, I., et al. (2009). Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood* *113*, 2324–2335.
- Neumar, R.W., Xu, Y.A., Gada, H., Guttman, R.P., and Siman, R. (2003). Cross-talk between calpain and caspase proteolytic systems during neuronal apoptosis. *J. Biol. Chem.* *278*, 14162–14167.

Newman, A.M., Gallo, N.B., Hancox, L.S., Miller, N.J., Radeke, C.M., Maloney, M.A., Cooper, J.B., Hageman, G.S., Anderson, D.H., Johnson, L. V, et al. (2012). Systems-level analysis of age-related macular degeneration reveals global biomarkers and phenotype-specific functional networks. *Genome Med.* 4, 16.

Nguyen, T., Sherratt, P.J., and Pickett, C.B. (2003). Regulatory Mechanisms Controlling Gene Expression Mediated By The Antioxidant Response Element. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 233–260.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Neuroscience: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* (80-.). 308, 1314–1318.

Nimmual, A.S., Taylor, L.J., and Bar-Sagi, D. (2003). Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat. Cell Biol.* 5, 236–241.

Nishiyama, K., Sakaguchi, H., Hu, J.G., Bok, D., and Hollyfield, J.G. (2002). Claudin localization in cilia of the retinal pigment epithelium. *Anat. Rec.* 267, 196–203.

Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K.K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Kliemannel, M., Schwarz, E., Willnow, T.E., et al. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427, 843–848.

Olney, J.W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* (80-.). 164, 719–721.

Omri, S., Behar-Cohen, F., De Kozak, Y., Sennlaub, F., Mafra Verissimo, L., Jonet, L., Savoldelli, M., Omri, B., and Crisanti, P. (2011). Microglia/macrophages migrate through retinal epithelium barrier by a transcellular route in diabetic retinopathy: Role of PKC in the Goto Kakizaki rat model. *Am. J. Pathol.* 179, 942–953.

Owsley, C., Jackson, G.R., White, M., Feist, R., and Edwards, D. (2001). Delays in rod-mediated dark adaptation in early age-related maculopathy. *Ophthalmology* 108, 1196–1202.

Ozaki, T., Nakazawa, M., Yamashita, T., Sorimachi, H., Hata, S., Tomita, H., Isago, H., Baba, A., and Ishiguro, S. ichi (2012). Intravitreal injection or topical eye-drop application of a μ -calpain C2L domain peptide protects against photoreceptor cell death in Royal College of Surgeons' rats, a model of retinitis pigmentosa. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1822, 1783–1795.

Pacher, P., Beckman, J.S., and Liaudet, L. (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 87, 315–424.

Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 383–400.

- Park, H.S., Park, J.Y., and Yu, R. (2005). Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF- α and IL-6. *Diabetes Res. Clin. Pract.* *69*, 29–35.
- Peeters, A., Magliano, D.J., Stevens, J., Duncan, B.B., Klein, R., and Wong, T.Y. (2008). Changes in abdominal obesity and age-related macular degeneration: The atherosclerosis risk in communities study. *Arch. Ophthalmol.* *126*, 1554–1560.
- Peri, F., and Nüsslein-Volhard, C. (2008). Live Imaging of Neuronal Degradation by Microglia Reveals a Role for v0-ATPase $\alpha 1$ in Phagosomal Fusion In Vivo. *Cell* *133*, 916–927.
- Piani, D., and Fontana, A. (1994). Involvement of the cystine transport system xc⁻ in the macrophage-induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. *J. Immunol.* *152*, 3578–3585.
- Pignataro, L., Sitaramayya, A., Finnemann, S.C., and Sarthy, V.P. (2005). Nonsynaptic localization of the excitatory amino acid transporter 4 in photoreceptors. *Mol. Cell. Neurosci.* *28*, 440–451.
- Pikuleva, I.A., and Curcio, C.A. (2014). Cholesterol in the retina: The best is yet to come. *Prog. Retin. Eye Res.* *41*, 64–89.
- Platón-Corchado, M., Barcelona, P.F., Jmaeff, S., Marchena, M., Hernández-Pinto, A.M., Hernández-Sánchez, C., Saragovi, H.U., and de la Rosa, E.J. (2017). p75NTR antagonists attenuate photoreceptor cell loss in murine models of retinitis pigmentosa. *Cell Death Dis.* *8*, e2922.
- Poitry, S., Poitry-Yamate, C., Ueberfeld, J., MacLeish, P.R., and Tsacopoulos, M. (2000). Mechanisms of glutamate metabolic signaling in retinal glial (Müller) cells. *J. Neurosci.* *20*, 1809–1821.
- Poulsen, C.F., Simeone, T.A., Maar, T.E., Smith-Swintosky, V., White, H.S., and Schousboe, A. (2004). Modulation by Topiramate of AMPA and Kainate Mediated Calcium Influx in Cultured Cerebral Cortical, Hippocampal and Cerebellar Neurons. *Neurochem. Res.* *29*, 275–282.
- Powner, M.B., Gillies, M.C., Zhu, M., Vevis, K., Hunyor, A.P., and Fruttiger, M. (2013). Loss of Müller's cells and photoreceptors in macular telangiectasia type 2. *Ophthalmology* *120*, 2344–2352.
- Puell, M.C., Barrio, A.R., Palomo-Alvarez, C., Gomez-Sanz, F.J., Clement-Corral, A., and Perez-Carrasco, M.J. (2012). Impaired mesopic visual acuity in eyes with early age-related macular degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* *53*, 7310–7314.
- Pulido, J.E., Pulido, J.S., Erie, J.C., Arroyo, J., Bertram, K., Lu, M.J., and Shippy, S.A. (2007). A role for excitatory amino acids in diabetic eye disease. *Exp. Diabetes Res.* *2007*, 1–7.

- Qin, S., Colin, C., Hinners, I., Gervais, A., Cheret, C., and Mallat, M. (2006). System Xc- and apolipoprotein E expressed by microglia have opposite effects on the neurotoxicity of amyloid-beta peptide 1-40. *J. Neurosci.* *26*, 3345–3356.
- Qiu, Z., Sweeney, D.D., Netzeband, J.G., and Gruol, D.L. (1998). Chronic interleukin-6 alters NMDA receptor-mediated membrane responses and enhances neurotoxicity in developing CNS neurons. *J. Neurosci.* *18*, 10445–10456.
- Raman, I.M., Zhang, S., and Trussell, L.O. (1994). Pathway-specific variants of AMPA receptors and their contribution to neuronal signaling. *J. Neurosci.* *14*, 4998–5010.
- Randolph, G.J., Inaba, K., Robbiani, D.F., Steinman, R.M., and Muller, W.A. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* *11*, 753–761.
- Rauen, T. (2000). Diversity of glutamate transporter expression and function in the mammalian retina. *Amino Acids* *19*, 53–62.
- Rauen, T., and Kanner, B.I. (1994). Localization of the glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retinae. *Neurosci. Lett.* *169*, 137–140.
- Rauen, T., and Wiessner, M. (2000). Fine tuning of glutamate uptake and degradation in glial cells: common transcriptional regulation of GLAST1 and GS. *Neurochem. Int.* *37*, 179–189.
- Rayapudi, S., Schwartz, S.G., Wang, X., and Chavis, P. (2013). Vitamin A and fish oils for retinitis pigmentosa. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, S.G. Schwartz, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), p. CD008428.
- Reed-Geaghan, E.G., Reed, Q.W., Cramer, P.E., and Landreth, G.E. (2010). Deletion of CD14 attenuates Alzheimer's disease pathology by influencing the brain's inflammatory milieu. *J. Neurosci.* *30*, 15369–15373.
- Reichenbach, A., and Bringmann, A. (2013). New functions of müller cells. *Glia* *61*, 651–678.
- Reichenbach, A., Stolzenburg, J.U., Eberhardt, W., Chao, T.I., Dettmer, D., and Hertz, L. (1993). What do retinal Müller (glial) cells do for their neuronal "small siblings"? *J. Chem. Neuroanat.* *6*, 201–213.
- Reif-lehrer, L., Bergenthal, J., and Hanninen, L. (1975). Effects of monosodium glutamate on chick embryo retina in culture. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* *14*, 114–124.
- Rezaie, P., and Male, D. (1999). Colonisation of the developing human brain and spinal cord by microglia: A review. *Microsc. Res. Tech.* *45*, 359–382.
- Riddell, D.R., Zhou, H., Atchison, K., Warwick, H.K., Atkinson, P.J., Jefferson, J., Xu, L., Aschmies, S., Kirksey, Y., Hu, Y., et al. (2008). Impact of Apolipoprotein E (ApoE) Polymorphism on Brain ApoE Levels. *J. Neurosci.* *28*, 11445–11453.

Riepe, R.E., and Norenburg, M.D. (1977). Müller cell localisation of glutamine synthetase in rat retina. *Nature* 268, 654–655.

Rizzolo, L.J. (2007). Development and Role of Tight Junctions in the Retinal Pigment Epithelium. *Int. Rev. Cytol.* 258, 195–234.

Rizzolo, L.J., Peng, S., Luo, Y., and Xiao, W. (2011). Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog. Retin. Eye Res.* 30, 296–323.

Robles, E., Huttenlocher, A., and Gomez, T.M. (2003). Filopodial calcium transients regulate growth cone motility and guidance through local activation of calpain. *Neuron* 38, 597–609.

Rofagha, S., Bhisitkul, R.B., Boyer, D.S., Sadda, S.R., and Zhang, K. (2013). Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: A multicenter cohort study (SEVEN-UP). *Ophthalmology* 120, 2292–2299.

Rosenfeld, P.J., Brown, D.M., Heier, J.S., Boyer, D.S., Kaiser, P.K., Chung, C.Y., and Kim, R.Y. (2006). Ranibizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* 355, 1419–1431.

Rossi, D.J., Oshima, T., and Attwell, D. (2000). Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403, 316–321.

Rossi, S., Furlan, R., De Chiara, V., Motta, C., Studer, V., Mori, F., Musella, A., Bergami, A., Muzio, L., Bernardi, G., et al. (2012). Interleukin-1 beta causes synaptic hyperexcitability in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 71, 76–83.

Rudnicka, A.R., Kapetanakis, V. V., Jarrar, Z., Wathern, A.K., Wormald, R., Fletcher, A.E., Cook, D.G., and Owen, C.G. (2015). Incidence of late-stage age-related macular degeneration in American whites: Systematic review and meta-analysis. *Am. J. Ophthalmol.* 160, 85–93.e3.

Rungger-Brandle, E., Messerli, J.M., Niemeyer, G., and Eppenberger, H.M. (1993). Confocal Microscopy and Computer-assisted Image Reconstruction of Astrocytes in the Mammalian Retina. *Eur. J. Neurosci.* 5, 1093–1106.

Rutar, M., Natoli, R., and Provis, J.M. (2012). Small interfering RNA-mediated suppression of Ccl2 in Müller cells attenuates microglial recruitment and photoreceptor death following retinal degeneration. *J. Neuroinflammation* 9, 221.

Sachdeva, M.M., Cano, M., and Handa, J.T. (2014). Nrf2 signaling is impaired in the aging RPE given an oxidative insult. *Exp. Eye Res.* 119, 111–114.

Saederup, N., Cardona, A.E., Croft, K., Mizutani, M., Cotleur, A.C., Tsou, C.L., Ransohoff, R.M., and 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.

- Sarks, S.H. (1976). Ageing and degeneration in the macular region: A clinico-pathological study. *Br. J. Ophthalmol.* *60*, 324–341.
- Sarks, J.P., Sarks, S.H., and Killingsworth, M.C. (1988). Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium. *Eye* *2*, 552–577.
- Sarma, J.V., and Ward, P.A. (2011). The complement system. *Cell Tissue Res.* *343*, 227–235.
- Sarthy, V.P., Pignataro, L., Pannicke, T., Weick, M., Reichenbach, A., Harada, T., Tanaka, K., and Marc, R. (2005). Glutamate transport by retinal Müller cells in glutamate/aspartate transporter-knockout mice. *Glia* *49*, 184–196.
- Sasaki, H., Sato, H., Kuriyama-Matsumura, K., Sato, K., Maebara, K., Wang, H., Tamba, M., Itoh, K., Yamamoto, M., and Bannai, S. (2002). Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression. *J. Biol. Chem.* *277*, 44765–44771.
- Sato, H., Takenaka, Y., Fujiwara, K., Yamaguchi, M., Abe, K., and Bannai, S. (1995). Increase in cystine transport activity and glutathione level in mouse peritoneal macrophages exposed to oxidized low-density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *215*, 154–159.
- Sato, H., Tamba, M., Ishii, T., and Bannai, S. (1999). Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J. Biol. Chem.* *274*, 11455–11458.
- Sato, H., Nomura, S., Maebara, K., Sato, K., Tamba, M., and Bannai, S. (2004). Transcriptional control of cystine/glutamate transporter gene by amino acid deprivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *325*, 109–116.
- Savaskan, N.E., Heckel, A., Hahnen, E., Engelhorn, T., Doerfler, A., Ganslandt, O., Nimsky, C., Buchfelder, M., and Eyüpoglu, I.Y. (2008). Small interfering RNA-mediated xCT silencing in gliomas inhibits neurodegeneration and alleviates brain edema. *Nat. Med.* *14*, 629–632.
- Schick, T., Ersoy, L., Lechanteur, Y.T.E., Saksens, N.T.M., Hoyng, C.B., den Hollander, A.I., Kirchhof, B., and Fauser, S. (2016). History of Sunlight Exposure Is a Risk Factor for Age-Related Macular Degeneration. *Retina* *36*, 787–790.
- Schinder, A.F., Olson, E.C., Spitzer, N.C., and Montal, M. (1996). Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* *16*, 6125–6133.
- Schlaf, G., Demberg, T., Beisel, N., Schieferdecker, H.L., and Götze, O. (2001). Expression and regulation of complement factors H and I in rat and human cells: Some critical notes. *Mol. Immunol.* *38*, 231–239.

Schmitz, D., Frerking, M., and Nicoll, R.A. (2000). Synaptic activation of presynaptic kainate receptors on hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 27, 327–338.

Schroder, K., and Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell* 140, 821–832.

Schubert, D., and Piasecki, D. (2001). Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade. *J. Neurosci.* 21, 7455–7462.

Schuettauf, F., Thaler, S., Bolz, S., Fries, J., Kalbacher, H., Mankowska, A., Zurakowski, D., Zrenner, E., and Rejdak, R. (2007). Alterations of amino acids and glutamate transport in the DBA/2J mouse retina; possible clues to degeneration. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 245, 1157–1168.

Schultz, K., and Stell, W.K. (1996). Immunocytochemical localization of the high-affinity glutamate transporter, EAAC1, in the retina of representative vertebrate species. *Neurosci. Lett.* 211, 191–194.

Schuman, S.G., Koreishi, A.F., Farsiu, S., Jung, S. ho, Izatt, J.A., and Toth, C.A. (2009). Photoreceptor Layer Thinning over Drusen in Eyes with Age-Related Macular Degeneration Imaged In Vivo with Spectral-Domain Optical Coherence Tomography. *Ophthalmology* 116, 488–496.e2.

Schweighofer, B., Testori, J., Sturtzel, C., Sattler, S., Mayer, H., Wagner, O., Bilban, M., and Hofer, E. (2009). The VEGF-induced transcriptional response comprises gene clusters at the crossroad of angiogenesis and inflammation. *Thromb. Haemost.* 102, 544–554.

Scuderi, S., D'amico, A.G., Federico, C., Saccone, S., Magro, G., Bucolo, C., Drago, F., and D'Agata, V. (2015). Different Retinal Expression Patterns of IL-1 α , IL-1 β , and Their Receptors in a Rat Model of Type 1 STZ-Induced Diabetes. *J. Mol. Neurosci.* 56, 431–439.

Seddon, J.M., Francis, P.J., George, S., Schultz, D.W., Rosner, B., and Klein, M.L. (2007). Association of CFH Y402H and LOC387715 A69S with progression of age-related macular degeneration. *J. Am. Med. Assoc.* 297, 1793–1800.

Seiler, A., Schneider, M., Förster, H., Roth, S., Wirth, E.K., Culmsee, C., Plesnila, N., Kremmer, E., Rådmark, O., Wurst, W., et al. (2008). Glutathione Peroxidase 4 Senses and Translates Oxidative Stress into 12/15-Lipoxygenase Dependent- and AIF-Mediated Cell Death. *Cell Metab.* 8, 237–248.

Seki, M., Tanaka, T., Nawa, H., Usui, T., Fukuchi, T., Ikeda, K., Abe, H., and Takei, N. (2004). Involvement of brain-derived neurotrophic factor in early retinal neuropathy of streptozotocin-induced diabetes in rats: Therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor for dopaminergic amacrine cells. *Diabetes* 53, 2412–2419.

Selkoe, D.J., and Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* 8, 595–608.

Sennlaub, F., Auvynet, C., Calippe, B., Lavalette, S., Poupel, L., Hu, S.J., Dominguez, E., Camelo, S., Levy, O., Guyon, E., et al. (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*, 1775–1793.

Serbina, N. V, Jia, T., Hohl, T.M., and Pamer, E.G. (2008). Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 421–452.

Shaftel, S.S., Griffin, W.S.T., and Kerry, K.M. (2008). The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: An evolving perspective. *J. Neuroinflammation* *5*, 7.

Shen, W., Fruttiger, M., Zhu, L., Chung, S.H., Barnett, N.L., Kirk, J.K., Lee, S., Coorey, N.J., Killingsworth, M., Sherman, L.S., et al. (2012). Conditional Muller Cell Ablation Causes Independent Neuronal and Vascular Pathologies in a Novel Transgenic Model. *J. Neurosci.* *32*, 15715–15727.

Shi, J., He, Y., Hewett, S.J., and Hewett, J.A. (2016). Interleukin 1 β Regulation of the System xc- Substrate-specific Subunit, xCT, in Primary Mouse Astrocytes Involves the RNA-binding Protein HuR. *J. Biol. Chem.* *291*, 1643–1651.

Shi, X., Semkova, I., Müther, P.S., Dell, S., Kociok, N., and Jousen, A.M. (2006). Inhibition of TNF- α reduces laser-induced choroidal neovascularization. *Exp. Eye Res.* *83*, 1325–1334.

Shih, A.Y., Johnson, D.A., Wong, G., Kraft, A.D., Jiang, L., Erb, H., Johnson, J.A., and Murphy, T.H. (2003). Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J. Neurosci.* *23*, 3394–3406.

Shih, A.Y., Erb, H., Sun, X., Toda, S., Kalivas, P.W., and Murphy, T.H. (2006). Cystine/Glutamate Exchange Modulates Glutathione Supply for Neuroprotection from Oxidative Stress and Cell Proliferation. *J. Neurosci.* *26*, 10514–10523.

Shukla, K., Thomas, A.G., Ferraris, D. V., Hin, N., Sattler, R., Alt, J., Rojas, C., Slusher, B.S., and Tsukamoto, T. (2011). Inhibition of x c - Transporter-mediated cystine uptake by sulfasalazine analogs. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* *21*, 6184–6187.

Si, Y., Tsou, C.-L., Croft, K., and Charo, I.F. (2010). CCR2 mediates hematopoietic stem and progenitor cell trafficking to sites of inflammation in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 1192–1203.

Silva, K.C., Rosales, M.A.B., Hamassaki, D.E., Saito, K.C., Faria, A.M., Ribeiro, P.A.O., Lopes de Faria, J.B., and Lopes de Faria, J.M. (2013). Green tea is neuroprotective in diabetic retinopathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* *54*, 1325–1336.

Simi, A., Tsakiri, N., Wang, P., and Rothwell, N.J. (2007). Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. *Biochem. Soc. Trans.* *35*, 1122–1126.

- Simó, R., and Hernández, C. (2014). Neurodegeneration in the diabetic eye: New insights and therapeutic perspectives. *Trends Endocrinol. Metab.* *25*, 23–33.
- Smoak, K.A., Aloor, J.J., Madenspacher, J., Merrick, B.A., Collins, J.B., Zhu, X., Cavigliolo, G., Oda, M.N., Parks, J.S., and Fessler, M.B. (2010). Myeloid differentiation primary response protein 88 couples reverse cholesterol transport to inflammation. *Cell Metab.* *11*, 493–502.
- Sommer, F., and Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 227–238.
- Sommer, B., Köhler, M., Sprengel, R., and Seeburg, P.H. (1991). RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* *67*, 11–19.
- Squadrito, G.L., Cueto, R., Splenser, A.E., Valavanidis, A., Zhang, H., Uppu, R.M., and Pryor, W.A. (2000). Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Arch. Biochem. Biophys.* *376*, 333–337.
- Starnes, A.C., Huisingh, C., McGwin, G., Sloan, K.R., Ablonczy, Z., Smith, R.T., Curcio, C.A., and Ach, T. (2016). Multi-nucleate retinal pigment epithelium cells of the human macula exhibit a characteristic and highly specific distribution. *Vis. Neurosci.* *33*, e001.
- Steinberg, R.H., Linsenmeier, R.A., and Griff, E.R. (1983). Three light-evoked responses of the retinal pigment epithelium. *Vision Res.* *23*, 1315–1323.
- Strauss, O. (2005). The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiol. Rev.* *85*, 845–881.
- Streilein, J.W., Wilbanks, G., and SW, C. (1992). Immunoregulatory mechanisms of the eye. *Prog. Retin. Eye Res.* *39*, 185–200.
- Streilein, J.W., Ma, N., Wenkel, H., Fong Ng, T., and Zamiri, P. (2002). Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Res.* *42*, 487–495.
- Stuehr, D.J., and Marletta, M.A. (1985). Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *82*, 7738–7742.
- Sullivan, P.M., Han, B., Liu, F., Mace, B.E., Ervin, J.F., Wu, S., Koger, D., Paul, S., and Bales, K.R. (2011). Reduced levels of human apoE4 protein in an animal model of cognitive impairment. *Neurobiol. Aging* *32*, 791–801.
- Sunness, J.S., Rubin, G.S., Applegate, C.A., Bressler, N.M., Marsh, M.J., Hawkins, B.S., and Haselwood, D. (1997). Visual function abnormalities and prognosis in eyes with age-related geographic atrophy of the macula and good visual acuity. *Ophthalmology* *104*, 1677–1691.

- Suzuki, M., Betsuyaku, T., Ito, Y., Nagai, K., Nasuhara, Y., Kaga, K., Kondo, S., and Nishimura, M. (2008). Down-regulated NF-E2-related factor 2 in pulmonary macrophages of aged smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39, 673–682.
- Swaroop, A., Branham, K.E.H., Chen, W., and Abecasis, G. (2007). Genetic susceptibility to age-related macular degeneration: A paradigm for dissecting complex disease traits. *Hum. Mol. Genet.* 16, R174–R182.
- Takahashi, J.L., Giuliani, F., Power, C., Imai, Y., and Yong, V.W. (2003). Interleukin-1 beta promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity. *Ann. Neurol.* 53, 588–595.
- Takaki, J., Fujimori, K., Miura, M., Suzuki, T., Sekino, Y., and Sato, K. (2012). L-glutamate released from activated microglia downregulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: The “collusion” hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* 9, 784.
- Takano, T., Lin, J.H.-C., Arcuino, G., Gao, Q., Yang, J., and Nedergaard, M. (2001). Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nat. Med.* 7, 1010–1015.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805–820.
- Tan, S., Sagara, Y., Liu, Y., Maher, P., and Schubert, D. (1998a). The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J. Cell Biol.* 141, 1423–1432.
- Tan, S., Wood, M., and Maher, P. (1998b). Oxidative stress induces a form of programmed cell death with characteristics of both apoptosis and necrosis in neuronal cells. *J. Neurochem.* 71, 95–105.
- Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Kikuchi, T., et al. (1997). Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276, 1699–1702.
- Tanihara, H., Yoshida, M., Matsumoto, M., and Yoshimura, N. (1993). Identification of transforming growth factor-beta expressed in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 413–419.
- Tao, W., Wen, R., Goddard, M.B., Sherman, S.D., O’Rourke, P.J., Stabila, P.F., Bell, W.J., Dean, B.J., Kauper, K.A., Budz, V.A., et al. (2002). Encapsulated cell-based delivery of CNTF reduces photoreceptor degeneration in animal models of retinitis pigmentosa. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 3292–3298.
- Tarallo, V., Hirano, Y., Gelfand, B.D., Dridi, S., Kerur, N., Kim, Y., Cho, W.G., Kaneko, H., Fowler, B.J., Bogdanovich, S., et al. (2012). DICER1 loss and Alu RNA induce age-related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88. *Cell* 149, 847–859.

Tate, D.J., Miceli, M. V, and Newsome, D.A. (1995). Phagocytosis and H₂O₂ induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *36*, 1271–1279.

Thompson, S.M., Capogna, M., and Scanziani, M. (1993). Presynaptic inhibition in the hippocampus. *Trends Neurosci.* *16*, 222–227.

Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J., et al. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature* *356*, 768–774.

Tout, S., Chan-Ling, T., Holländer, H., and Stone, J. (1993). The role of müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience* *55*, 291–301.

Tsacopoulos, M., and Magistretti, P.J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci.* *16*, 877–885.

Turner, J.D., Bourke, C.D., Meurs, L., Mbow, M., Di??ye, T.N., Mboup, S., Polman, K., and Mountford, A.P. (2014). Circulating CD14^{bright}CD16⁺ “Intermediate” Monocytes Exhibit Enhanced Parasite Pattern Recognition in Human Helminth Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *8*, e2817.

Uehara, T., Nakamura, T., Yao, D., Shi, Z.Q., Gu, Z., Ma, Y., Masliah, E., Nomura, Y., and Lipton, S.A. (2006). S-Nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature* *441*, 513–517.

Vandenbergh, W., Robberecht, W., and Brorson, J.R. (2000). AMPA receptor calcium permeability, GluR2 expression, and selective motoneuron vulnerability. *J. Neurosci.* *20*, 123–132.

Varma, R., Bressler, N.M., Doan, Q. V., Danese, M., Dolan, C.M., Lee, A., and Turpcu, A. (2015). Visual impairment and blindness avoided with ranibizumab in hispanic and non-hispanic whites with diabetic macular edema in the United States. *Ophthalmology* *122*, 982–989.

Vessey, M.P., Villard-Mackintosh, L., and Yeates, D. (1987). Oral contraceptives, cigarette smoking and other factors in relation to arthritis. *Contraception* *35*, 457–464.

Vonsattel, J.P., and DiFiglia, M. (1998). Huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *57*, 369–384.

Vojarova, B., Weyer, C., Hanson, K., Tataranni, P.A., Bogardus, C., and Pratley, R.E. (2001). Circulating Interleukin-6 in Relation to Adiposity, Insulin Action, and Insulin Secretion. *Obes. Res.* *9*, 414–417.

Wakabayashi, Y., Yagihashi, T., Kezuka, J., Muramatsu, D., Usui, M., and Iwasaki, T. (2006). Glutamate levels in aqueous humor of patients with retinal artery occlusion. *Retina* *26*, 432–436.

- Wang, G. (2014). Chromosome 10q26 locus and age-related macular degeneration: A progress update. *Exp. Eye Res.* *119*, 1–7.
- Wang, X., and Michaelis, E.K. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front. Aging Neurosci.* *2*, 12.
- Wang, X.F., and Cynader, M.S. (2000). Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. *J. Neurochem.* *74*, 1434–1442.
- Wang, J.J., Foran, S., Smith, W., and Mitchell, P. (2003). Risk of age-related macular degeneration in eyes with macular drusen or hyperpigmentation: The Blue Mountains Eye Study cohort. *Arch. Ophthalmol.* *121*, 658–663.
- Wang, K., Zhu, X., Zhang, K., Wu, Z., Sun, S., Zhou, F., and Zhu, L. (2016). Neuroprotective Effect of Puerarin on Glutamate-Induced Cytotoxicity in Differentiated Y-79 Cells via Inhibition of ROS Generation and Ca(2+) Influx. *Int. J. Mol. Sci.* *17*, 1109.
- Wang, M., Ma, W., Zhao, L., Fariss, R.N., and Wong, W.T. (2011). Adaptive Müller cell responses to microglial activation mediate neuroprotection and coordinate inflammation in the retina. *J. Neuroinflammation* *8*, 173.
- Ward, M.M., Jobling, A.I., Puthussery, T., Foster, L.E., and Fletcher, E.L. (2004). Localization and expression of the glutamate transporter, excitatory amino acid transporter 4, within astrocytes of the rat retina. *Cell Tissue Res.* *315*, 305–310.
- Watson, J.F., Ho, H., and Greger, I.H. (2017). Synaptic transmission and plasticity require AMPA receptor anchoring via its N-terminal domain. *Elife* *6*.
- Watzke, N., and Grewer, C. (2001). The anion conductance of the glutamate transporter EAAC1 depends on the direction of glutamate transport. *FEBS Lett.* *503*, 121–125.
- Wenkel, H., and Streilein, J.W. (2000). Evidence that retinal pigment epithelium functions as an immune-privileged tissue. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* *41*, 3467–3473.
- Whiteley, S.J., Klassen, H., Coffey, P.J., and Young, M.J. (2001). Photoreceptor rescue after low-dose intravitreal IL-1beta injection in the RCS rat. *Exp Eye Res* *73*, 557–568.
- Wilding, T.J., Zhou, Y., and Huettner, J.E. (2005). Q/R Site Editing Controls Kainate Receptor Inhibition by Membrane Fatty Acids. *J. Neurosci.* *25*, 9470–9478.
- Wong, T.Y., Klein, R., Islam, F.M.A., Cotch, M.F., Folsom, A.R., Klein, B.E.K., Sharrett, A.R., and Shea, S. (2006). Diabetic Retinopathy in a Multi-ethnic Cohort in the United States. *Am. J. Ophthalmol.* *141*, 446–455.e1.
- Wong, W.L., Su, X., Li, X., Cheung, C.M.G., Klein, R., Cheng, C.Y., and Wong, T.Y. (2014). Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Heal.* *2*, e106–e116.

- Xu, H., Dawson, R., Crane, I.J., and Liversidge, J. (2005). Leukocyte diapedesis in vivo induces transient loss of tight junction protein at the blood-retina barrier. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 2487–2494.
- Xu, H., Chen, M., Manivannan, A., Lois, N., and Forrester, J. V. (2008). Age-dependent accumulation of lipofuscin in perivascular and subretinal microglia in experimental mice. *Aging Cell* 7, 58–68.
- Xu, H., Chen, M., and Forrester, J. V. (2009). Para-inflammation in the aging retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 28, 348–368.
- Yamasaki, Y., Matsuura, N., Shozuhara, H., Onodera, H., Itoyama, Y., and Kogure, K. (1995). Interleukin-1 as a Pathogenetic Mediator of Ischemic Brain Damage in Rats. *Stroke* 26, 676–681.
- Yang, Z., Camp, N.J., Sun, H., Tong, Z., Gibbs, D., Cameron, D.J., Chen, H., Zhao, Y., Pearson, E., Li, X., et al. (2006). A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science* (80-.). 314, 992–993.
- Yaspan, B.L., Williams, D.F., Holz, F.G., Regillo, C.D., Li, Z., Dressen, A., Van Lookeren Campagne, M., Le, K.N., Graham, R.R., Beres, T., et al. (2017). Targeting factor D of the alternative complement pathway reduces geographic atrophy progression secondary to age-related macular degeneration. *Sci. Transl. Med.* 9, eaaf1443.
- Ye, Z.C., and Sontheimer, H. (1999). Metabotropic glutamate receptor agonists reduce glutamate release from cultured astrocytes. *Glia* 25, 270–81.
- Ye, Z.C., Rothstein, J.D., and Sontheimer, H. (1999). Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange. *J. Neurosci.* 19, 10767–10777.
- Yu, Y., Reynolds, R., Rosner, B., Daly, M.J., and Seddon, J.M. (2012). Prospective assessment of genetic effects on progression to different stages of age-related macular degeneration using multistate markov models. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 1548–1556.
- Yu, Z.F., Bruce-Keller, A.J., Goodman, Y., and Mattson, M.P. (1998). Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo. *J. Neurosci. Res.* 53, 613–625.
- Zabel, M.K., Zhao, L., Zhang, Y., Gonzalez, S.R., Ma, W., Wang, X., Fariss, R.N., and Wong, W.T. (2016). Microglial phagocytosis and activation underlying photoreceptor degeneration is regulated by CX3CL1-CX3CR1 signaling in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Glia* 64, 1479–1491.
- Zerangue, N., and Kavanaugh, M.P. (1996). Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 383, 634–637.

Zhang, H., Li, Q., Graham, R.K., Slow, E., Hayden, M.R., and Bezprozvanny, I. (2008). Full length mutant huntingtin is required for altered Ca²⁺ signaling and apoptosis of striatal neurons in the YAC mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* *31*, 80–88.

Zhao, H., Roychoudhury, J., Doggett, T.A., Apte, R.S., and Ferguson, T.A. (2013). Age-dependent changes in fasl (CD95L) modulate macrophage function in a model of age-related macular degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* *54*, 5321–5331.

Zhao, L., Zabel, M.K., Wang, X., Ma, W., Shah, P., Fariss, R.N., Qian, H., Parkhurst, C.N., Gan, W.-B., and Wong, W.T. (2015). Microglial phagocytosis of living photoreceptors contributes to inherited retinal degeneration. *EMBO Mol. Med.* *7*, 1179–1197.

Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.J., MacPherson, G., Randolph, G.J., et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* *116*, e74–e80.

Zipfel, P.F., and Skerka, C. (2009). Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 729–740.

ANNEXES

Table des illustrations

Figure 1 : Anatomie de l'œil humain en coupe transversale (Page 14).

Figure 2 : Anatomie de la rétine en coupe sagittale (Page 15).

Figure 3 : Distribution des photorécepteurs dans la rétine humaine (Page 17).

Figure 4 : L'épithélium pigmentaire rétinien (Page 19).

Figure 5 : Structure des photorécepteurs, cônes et bâtonnets (Page 21).

Figure 6 : Le réseau neuronal rétinien (Page 23).

Figure 7 : La cellule gliale de Müller (Page 25).

Figure 8 : Microglie ramifiée et non ramifiée (Page 26).

Figure 9 : Environnement immunosuppresseur de la rétine externe (Page 30).

Figure 10 : La DMLA, une pathologie évolutive (Page 34).

Figure 11 : Accumulation des phagocytes mononucléés dans la DMLA (Page 36).

Figure 12 : Les variants génétiques associés à la DMLA influencent l'inflammation (Page 38).

Figure 13 : Origine et différenciation des monocytes (Page 41).

Figure 14 : Les marqueurs CD14 et CD16 permettent d'identifier les sous-populations de monocytes (Page 42).

Figure 15 : Origine des macrophages chez la souris (Page 43).

Figure 16 : L'accumulation des macrophages inflammatoires est associée à la dégénérescence rétinienne (Page 45).

Figure 17 : Représentation schématique de l'activation du cluster de récepteurs liés à l'immunité innée (IIRC) par l'apolipoprotéine E (Page 47).

Figure 18 : Le facteur H du complément inhibe la résolution de l'inflammation médiée par CD47 (Page 50).

Figure 19 : La production de cytokines inflammatoires par les phagocytes mononucléés induit le dysfonctionnement et la dégénérescence de la rétine externe (Page 51).

Figure 20 : Cycle de transport et stoechiométrie des EAATs (Page 58).

Figure 21 : Représentation schématique du système x_c^- (Page 59).

Figure 22 : Le cycle rétinien du glutamate – Régulations à l'échelle des photorécepteurs (Page 62).

Figure 23 : Schéma représentant les principales voies de signalisation impliquées dans l'excitotoxicité (Page 67).

Figure 24 : Toxicité oxydative du glutamate, la mort neuronale induite par l'inhibition du système x_c^- (Page 70).

Articles complémentaires

Article 3 : *Complement Factor H Inhibits CD47-Mediated Resolution of Inflammation*

Bertrand Calippe*, Sébastien Augustin*, Fanny Beguier, **Hugo Charles-Messance**, Lucie Poupel, Jean-Baptiste Conart, Shulong J. Hu, Sophie Lavalette, Alexandre Fauvet, Julie Rayes, Olivier Levy, William Raoul, Catherine Fitting, Thomas Denèfle, Matthew C. Pickering, Claire Harris, Sylvie Jorieux, Patrick M. Sullivan, José-Alain Sahel, Philippe Karoyan, Przemyslaw Sapieha, Xavier Guillonneau, Emmanuel L. Gautier, et Florian Sennlaub.

Immunity. 2017

Participation à l'article : Investigation et reviewing

Figure 2E : Expérimentation, acquisition et analyse des données

Figures supplémentaires : Participation à l'expérimentation, l'acquisition et l'analyse des données

Complement Factor H Inhibits CD47-Mediated Resolution of Inflammation

Bertrand Calippe,^{1,11} Sebastien Augustin,^{1,11} Fanny Beguier,¹ Hugo Charles-Messance,¹ Lucie Poupel,² Jean-Baptiste Conart,¹ Shulong J. Hu,¹ Sophie Lavalette,¹ Alexandre Fauvet,¹ Julie Rayes,³ Olivier Levy,¹ William Raoul,¹ Catherine Fitting,¹⁰ Thomas Denèfle,⁸ Matthew C. Pickering,⁴ Claire Harris,⁵ Sylvie Jorieux,⁶ Patrick M. Sullivan,⁷ José-Alain Sahel,¹ Philippe Karoyan,⁸ Przemyslaw Sapieha,⁹ Xavier Guillonneau,¹ Emmanuel L. Gautier,² and Florian Sennlaub^{1,12,*}

¹Institut de la Vision, 17 rue Moreau, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, 75012 Paris, France

²Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM UMR-S 1166, Faculté de médecine Pitié-Salpêtrière, 91 Boulevard de l'hôpital, 75013 Paris, France

³Université Paris Descartes, Unité Mixte de Recherche en Santé 872, Centre de Recherche des Cordeliers, 75006 Paris, France

⁴Centre for Complement and Inflammation Research, Department of Medicine, Imperial College, London W12 0NN, UK

⁵Institute of Infection and Immunity, Cardiff University, Cardiff CF10 3XQ, UK

⁶LFB Biotechnologies, 59000 Lille, France

⁷Department of Medicine, Centers for Aging and Geriatric Research Education and Clinical Center, Durham Veteran Affairs Medical Center, Duke University, Durham, NC 27710, USA

⁸Laboratoire des Biomolécules, UMR 7203 and FR 2769, Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France; Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7203 Paris, France; Département de Chimie, École Normale Supérieure, 75005 Paris, France

⁹Department of Ophthalmology, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, QC H3T 1J4, Canada

¹⁰Unité Cytokines & Inflammation, Département Infection et Epidémiologie, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

¹¹Co-first author

¹²Lead Contact

*Correspondence: florian.sennlaub@inserm.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.01.006>

SUMMARY

Variants of the *CFH* gene, encoding complement factor H (CFH), show strong association with age-related macular degeneration (AMD), a major cause of blindness. Here, we used murine models of AMD to examine the contribution of CFH to disease etiology. *Cfh* deletion protected the mice from the pathogenic subretinal accumulation of mononuclear phagocytes (MP) that characterize AMD and showed accelerated resolution of inflammation. MP persistence arose secondary to binding of CFH to CD11b, which obstructed the homeostatic elimination of MPs from the subretinal space mediated by thrombospondin-1 (TSP-1) activation of CD47. The AMD-associated CFH(H402) variant markedly increased this inhibitory effect on microglial cells, supporting a causal link to disease etiology. This mechanism is not restricted to the eye, as similar results were observed in a model of acute sterile peritonitis. Pharmacological activation of CD47 accelerated resolution of both subretinal and peritoneal inflammation, with implications for the treatment of chronic inflammatory disease.

INTRODUCTION

Age-related macular degeneration (AMD) is a heritable neuroinflammatory disorder characterized by deposits of lipoproteinaceous debris called large drusen (early AMD), choroidal neovascularization (wet AMD, late form), and an extending lesion of the retinal pigment epithelium (RPE) and photoreceptors (geographic atrophy, GA, late form) (Sarks, 1976). Early AMD afflicts more than 150 million people worldwide, and 10 million people suffer from late AMD (Wong et al., 2014). AMD is strongly associated with common and rare genetic variants of the *CFH* gene, encoding complement factor H (CFH), suggesting a causal role for alterations in CFH expression or function in the pathogenesis of this disease (Fritsche et al., 2014). However, the mechanisms through which these alterations may lead to or contribute to AMD are not well understood.

CFH is an abundant soluble plasma factor composed of 20 short consensus repeat domains (SCR) with important roles in inflammation (Kopp et al., 2012) and coagulation (Rayes et al., 2014) and as an antioxidant (Weismann et al., 2011). The SCR7 domain of CFH binds to glycosaminoglycans (GAG) on cell surfaces, where it inhibits complement activation (Kopp et al., 2012). This domain also allows CFH to bind to myeloid cells via the integrin CD11b (that forms, with CD18, the complement 3 receptor), supporting myeloid cell adhesion and migration, as well as the phagocytosis of microbes and cell debris (DiScipio et al., 1998; Kang et al., 2012; Losse et al., 2010). At inflammatory sites,



Article 4 : *AAV-Mediated Gene Therapy in Dystrophin-Dp71 Deficient Mouse Leads to Blood-Retinal Barrier Restoration and Oedema Reabsorption*

Ophélie Vacca, **Hugo Charles-Messance**, Brahim El Mathari, Abdoulaye Sene, Peggy Barbe, Stéphane Fouquet, Jorge Aragon, Marie Darche, Audrey Giocanti-Aurégan, Michel Pâques, José-Alain Sahel, Ramin Tadayoni, Cecilia Montanez, Deniz Dalkara, et Alvaro Rendon.

Human Molecular Genetics. 2016

Participation à l'article : Investigation et reviewing

Figure 1 : Acquisition et analyse des données

Figure 2 : Participation à l'acquisition et analyse des données

Figure 3 : Participation à l'acquisition et analyse des données

Figure 4A : Acquisition et analyse des données

Figure 4B : Participation à l'acquisition et analyse des données

Figure 5B et C : Participation à l'acquisition et analyse des données

ORIGINAL ARTICLE

AAV-mediated gene therapy in Dystrophin-Dp71 deficient mouse leads to blood-retinal barrier restoration and oedema reabsorption

Ophélie Vacca^{1,2,*}, Hugo Charles-Messance¹, Brahim El Mathari¹, Abdoulaye Sene³, Peggy Barbe¹, Stéphane Fouquet¹, Jorge Aragón^{1,4}, Marie Darche¹, Audrey Giocanti-Aurégan^{1,5}, Michel Paques^{1,6}, José-Alain Sahel^{1,6}, Ramin Tadayoni^{1,7}, Cecilia Montañez⁴, Deniz Dalkara¹ and Alvaro Rendon¹

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, 75012 Paris, France, ²Neuroscience Paris-Saclay Institute (NeuroPSI)–CNRS UMR 9197–Université Paris-Sud, Cognition & Behavior, 91405 Orsay cedex, France, ³Department of Ophthalmology, Therapeutic, Saint Louis, MO 63103, USA, ⁴Department of Genetics & Molecular Biology, CINVESTAV: Research Centre for Advanced Studies, IPN, C.P. 07360 México, ⁵Ophthalmology Department, Avicenne Hospital, 93000 Bobigny, France, ⁶CHNO des Quinze-Vingts, DHU Sight Restore, INSERM-DHOS CIC, 75012 Paris, France and ⁷Ophthalmology Dept, Hôpital Lariboisière, AP-HP, Univ Paris Diderot, 75010 Paris, France

*To whom correspondence should be addressed at: Email: ophelie.vacca@gmail.com

Abstract

Dystrophin-Dp71 being a key membrane cytoskeletal protein, expressed mainly in Müller cells that provide a mechanical link at the Müller cell membrane by direct binding to actin and a transmembrane protein complex. Its absence has been related to blood-retinal barrier (BRB) permeability through delocalization and down-regulation of the AQP4 and Kir4.1 channels (1). We have previously shown that the adeno-associated virus (AAV) variant, ShH10, transduces Müller cells in the Dp71-null mouse retina efficiently and specifically (2,3). Here, we use ShH10 to restore Dp71 expression in Müller cells of Dp71 deficient mouse to study molecular and functional effects of this restoration in an adult mouse displaying retinal permeability. We show that strong and specific expression of exogenous Dp71 in Müller cells leads to correct localization of Dp71 protein restoring all protein interactions in order to re-establish a proper functional BRB and retina homeostasis thus preventing retina from oedema. This study is the basis for the development of new therapeutic strategies in dealing with diseases with BRB breakdown and macular oedema such as diabetic retinopathy (DR).

Received: December 16, 2015. Revised: April 28, 2016. Accepted: May 19, 2016

© The Author 2016. Published by Oxford University Press.

All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

Article 5 : *Dystrophin Dp71 Gene Deletion Induces Retinal Vascular Inflammation and Capillary Degeneration*

Brahim El Mathari, Abdoulaye Sene, **Hugo Charles-Messance**, Ophélie Vacca, Xavier Guillonneau, Claudine Grepin, Florian Sennlaub, José-Alain Sahel, Alvaro Rendon, et Ramin Tadayoni.

Human Molecular Genetics. 2015

Participation à l'article : Investigation

Figure 1 : Participation à l'acquisition et analyse des données

Figure 2 : Participation à l'acquisition et analyse des données

Figure 5A et B : Acquisition et analyse des données

Figure 7A : Acquisition et analyse des données

ORIGINAL ARTICLE

Dystrophin Dp71 gene deletion induces retinal vascular inflammation and capillary degeneration

Brahim El Mathari^{1,2}, Abdoulaye Sene³, Hugo Charles-Messance¹, Ophélie Vacca¹, Xavier Guillonneau¹, Claudine Grepin², Florian Sennlaub¹, José-Alain Sahel^{1,4,5,6}, Alvaro Rendon^{1,†} and Ramin Tadayoni^{1,7,*†}

¹Institut de la Vision/INSERM/UPMC, Univ Paris 06/CNRS/CHNO des Quinze-Vingts, Paris, France, ²Sanofi Fovea—Ophthalmology, Paris, France, ³Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Washington University School of Medicine, Saint Louis, MO, USA, ⁴Fondation Ophtalmologique Adolphe de Rothschild, Paris, France, ⁵Institute of Ophthalmology, University College of London, UK, ⁶Académie des Sciences—Institut de France, Paris, France and ⁷Ophthalmology Department, Hôpital Lariboisière (AP-HP) 2, Université Paris 7, Sorbonne Paris Cité, rue Ambroise Paré, 75010 Paris, France

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 608563347; Fax: +33 149956483; Email: ramin.tadayoni@lrp.aphp.fr

Abstract

We have previously shown that the deletion of the dystrophin Dp71 gene induces a highly permeable blood–retinal barrier (BRB). Given that BRB breakdown is involved in retinal inflammation and the pathophysiology of many blinding eye diseases, here we investigated whether the absence of Dp71 brings out retinal vascular inflammation and vessel loss by using specific Dp71-null mice. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), quantified by quantitative polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay methods, was higher in the retina of Dp71-null mice than in wild-type mice. In contrast, no differences were observed in VEGFR-2 and tumor necrosis factor- α expression. Moreover, mRNA expression of water channel, aquaporin 4 (AQP4) was increased after Dp71 deletion. The Dp71 deletion was also associated with the overexpression of intercellular adhesion molecule 1, which is expressed on endothelial cells surface to recruit leukocytes. Consistent with these findings, the total number of adherent leukocytes per retina, assessed after perfusion with fluorescein isothiocyanate-conjugated concanavalin A, was increased in the absence of Dp71. Finally, a significant increase in capillary degeneration quantified after retinal trypsin digestion was observed in mice lacking Dp71. These data illustrate for the first time that the deletion of Dp71 was associated with retinal vascular inflammation, vascular lesions with increased leukocyte adhesion and capillary degeneration. Thus, dystrophin Dp71 could play a critical role in retinal vascular inflammation disease, and therefore represent a potential therapeutic target.

Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene (2.5 Mb), located on X chromosome, is composed of 79 exons (1,2). Different mutations in this gene induce progressive wasting of skeletal and cardiac muscles in DMD and Becker muscular dystrophy (BMD)

patients (3). One-third of these patients present also cognitive impairments associated with cortical ischemic infarcts (4). In the retina, when measured in dark-adapted (scotopic) conditions, the electroretinogram (ERG) shows reduced amplitude of the b-wave response in 80% of DMD patients (5). Moreover, it

[†] These authors contributed equally to this work.

Received: October 12, 2014. Revised and Accepted: April 9, 2015

© The Author 2015. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Article 6 : *Protection of Glial Müller Cells by Dexamethasone in a Mouse Model of Surgically Induced Blood-Retinal Barrier Breakdown*

Lourdes Siqueiros-Marquez, Romain Bénard, Ophélie Vacca, **Hugo Charles-Messance**, Rodrigo Bolanos-Jimenez, Xavier Guillonneau, Florian Sennlaub, Cecilia Montanez, José-Alain Sahel, Alvaro Rendon, Ramin Tadayoni, et Audrey Giocanti-Aurégan.

Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2017

Participation à l'article : Investigation et reviewing

Figure 2B : Participation à l'acquisition et analyse des données

Figure 6F : Acquisition et analyse des données

Protection of Glial Müller Cells by Dexamethasone in a Mouse Model of Surgically Induced Blood–Retinal Barrier Breakdown

Lourdes Siqueiros-Marquez,^{1,2} Romain Bénard,¹ Ophélie Vacca,¹ Hugo Charles-Messance,¹ Rodrigo Bolaños-Jimenez,¹ Xavier Guilloneau,¹ Florian Sennlaub,¹ Cecilia Montañez,² José Alain Sahel,^{1,3,4} Alvaro Rendon,¹ Ramin Tadayoni,^{1,5} and Audrey Giocanti-Aurégan^{1,6}

¹Sorbonne Universités, Pierre et Marie Curie University, University Paris 06, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique Institut de la Vision, Paris, France

²Department of Genetics & Molecular Biology, Research Centre for Advanced Studies, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

³Centre Hospitalier National d’Ophtalmologie des Quinze-Vingts, Département Hospitalo-Universitaire (DHU) Sight Restore, INSERM-Direction de l’Hospitalisation et de la Direction des Soins Centre d’Investigation Clinique, Paris, France

⁴Fondation Ophtalmologique Adolphe de Rothschild, Département Hospitalo-Universitaire (DHU) Sight Restore, Paris, France

⁵Ophthalmology Department, Hôpital Lariboisière, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP), University Paris 7, DHU Vision and Handicaps–Sorbonne Paris Cité, Paris, France

⁶Ophthalmology Department, Avicenne Hospital, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP), University Paris 13, DHU Vision and Handicaps, Bobigny, France

Correspondence: Audrey Giocanti-Aurégan, Ophthalmology Department, Avicenne Hospital, AP-HP, University Paris 13, DHU Vision and Handicaps, 125 Rue de Stalingrad, Bobigny, France; audrey.giocanti@aphp.fr

Submitted: August 25, 2016

Accepted: January 3, 2017

Citation: Siqueiros-Marquez L, Bénard R, Vacca O, et al. Protection of glial Müller cells by dexamethasone in a mouse model of surgically induced blood–retinal barrier breakdown. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58:876–886. DOI:10.1167/iovs.16-20617

PURPOSE. Breakdown of the inner blood–retinal barrier (iBRB) occurs in many retinal disorders and may cause retinal edema often responsible for vision loss. Dexamethasone is used in clinical practice to restore iBRB. The aim of this study was to characterize the impact of a surgically induced iBRB breakdown on retinal homeostatic changes due to dystrophin Dp71, aquaporin-4 (AQP4), and Kir4.1 alterations in Müller glial cells (MGC) in a mouse model. The protective effect of dexamethasone was assessed in this model. Moreover, retinal explants were used to control MGC exposure to a hypoosmotic solution containing barium.

METHODS. Partial lens surgery was performed in C57BL6/J mice. Dystrophin Dp71, AQP4, and Kir4.1 expression was analyzed by quantitative RT-PCR, Western blot, and immunohistochemistry. Twenty-four hours after surgery, mice received a single intravitreal injection of dexamethasone or of vehicle.

RESULTS. After partial lens surgery, iBRB permeability increased while Dp71 and AQP4 were downregulated and Kir4.1 was delocalized. These effects were partially prevented by dexamethasone injection. In the retinal explant model, MGC were swollen and Dp71, AQP4, and Kir4.1 were downregulated after exposure to a hypoosmotic solution containing barium, but not in the presence of dexamethasone. Heat shock factor protein 1 (HSF1) was overexpressed in dexamethasone-treated retinas.

CONCLUSIONS. Partial lens surgery induces iBRB breakdown and molecular changes in MGC, including a downregulation of Dp71 and AQP4 and the delocalization of Kir4.1. Dexamethasone seems to protect retina from these molecular changes by upregulating HSF1.

Keywords: blood-retinal barrier, retinal edema, Irvine Gass syndrome, dystrophin Dp71 mouse model, ocular surgery, macular edema, dexamethasone

Müller glial cells (MGC) and astrocytes participate in the formation and maintenance of the inner blood–retinal barrier (iBRB), which is required for a normal vision. Transport processes and tight junctions between the vascular endothelial cells composing the iBRB regulate the flow of ions, nutrients, water, and toxic molecules between the retina and vessels to preserve the proper balance necessary for neuronal function.¹ The loss of iBRB alters the balance of fluids between retinal tissues and retinal vessels. It may cause retinal edema with intraretinal fluid accumulation that may be partially compensated by the continuous fluid reabsorption by MGC² and the retinal pigment epithelium.³

Müller glial cells are the predominant type of glial cells in the vertebrate retina, and they regulate retinal extracellular

ionic homeostasis^{4,5} through cooperation between the rectifying potassium channel Kir4.1^{6,7} and the selective water transport protein, aquaporin-4 (AQP4). In normal mouse retina, AQP4 and Kir4.1 are strongly expressed in MGC and mainly localized at MGC endfeet and in processes surrounding the blood vessels. In many retinal diseases, including diabetic retinopathy, retinal vein occlusion, and retinal detachment with iBRB breakdown, the expression and distribution of these channels are altered in MGC.^{8–11} Another important function of MGC is the uptake of neurotransmitters supporting the synaptic activity. A MGC is a neurotransmitter recycler whose neuroprotective effect prevents retinal neurons from the long-lasting toxicity of neurotransmitters.^{12,13} These phenomena are



Article 7 : *Chronic Exposure to Tumor Necrosis Factor Induces Retinal Pigment Epithelium Cell Dedifferentiation*

Sara Touhami, Fanny Beguier, Sébastien Augustin, Hugo Charles-Messance, Emeline Nandrot, Sacha Reichmann, Olivier Goureau, José-Alain Sahel, Xavier Guillonnet, Bahram Bodaghi et Florian Sennlaub

(Accepté dans **Journal of Neuroinflammation**).

Résumé :

La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA) est la première cause de cécité légale dans les pays industrialisés chez les personnes âgées. L'atrophie géographique – l'une des formes tardives de la DMLA - est caractérisée par la perte de l'épithélium pigmentaire et la dégénérescence des photorécepteurs. Nous avons montré précédemment que dans l'atrophie géographique, les phagocytes mononucléés (PMs) s'accumulent dans l'espace sous-rétinien, et induisent la dégénérescence rétinienne via la production d'IL-1 β . Dans un premier temps, nous montrons que la présence de PMs sous-rétiniens est associée à la perte des bâtonnets et la dégénérescence des segments de cônes dans la zone de transition de patients atrophiques. Nous montrons ensuite dans différents modèles *in vivo* et *ex vivo* que les macrophages recapitulent ces effets, et qu'IL-1 β est nécessaire à la perte des segments externes des cônes induite par les PMs. Dans un deuxième temps, nos résultats montrent qu'IL-1 β induit indirectement la mort des bâtonnets, en perturbant l'homéostasie rétinienne du glutamate. L'inhibition des récepteurs glutamatergiques pour prévenir l'excitotoxicité du glutamate, ou la supplémentation en cystine favorisant la restauration de la machinerie neuronale antioxydante, permettent de protéger les bâtonnets de la toxicité induite par IL-1 β . L'ensemble de nos résultats démontre le rôle joué par IL-1 β dans la dégénérescence des segments de cônes et la perte des bâtonnets dans l'inflammation sous-rétinienne. Cette étude permettra la mise au point de thérapies innovantes, afin de lutter contre la forme atrophique de la DMLA, pour laquelle il n'existe actuellement aucun traitement.

Mots clés: Dégénérescence maculaire liée à l'âge, rétine, phagocytes mononucléés, IL-1 β , photorécepteurs, glutamate

Role of IL-1 β in photoreceptor degeneration associated with Age-related Macular Degeneration

Abstract:

In geographic atrophy (GA), one of the late forms of Age-related Macular Degeneration (AMD), an extending atrophic zone forms, characterized by the loss of retinal pigment epithelium and photoreceptor degeneration. Subretinal mononuclear phagocytes (MPs) accumulate in GA, and are associated with IL-1 β -dependent retinal degeneration. First, we confirmed that subretinal accumulation of MPs is associated with rod degeneration and cone segment loss in the transitional zone in GA human samples. Using *ex vivo* and *in vivo* models, we then demonstrated that MPs-derived IL-1 β leads to severe cone segment degeneration. Therefore, inhibiting subretinal MP accumulation or IL-1 β might protect the cone segment, and help preserve high acuity daytime vision in conditions characterized by subretinal inflammation. Second, we showed that IL-1 β effect on rod degeneration is indirect, and mediated by glutamate. Our results indicate that IL-1 β impairs Müller glial cells glutamate recycling, and subsequently leads to the extracellular increase in glutamate content. Inhibiting glutamate receptors to prevent excitotoxicity, or exogenous cystine supplementation to supply antioxidant metabolism, are sufficient to protect rods from IL-1 β -induced neurotoxicity. Our results provide new perspectives to treat pathologies associated with subretinal inflammation such as late AMD. Our results collectively demonstrated that MP-derived IL-1 β induces cone segment loss, and glutamate homeostasis disruption associated with rod degeneration. This study will help with the development of new therapeutic strategies in dealing with inflammatory retinal pathologies as geographic atrophy.

Keywords: Age-related macular degeneration, retina, mononuclear phagocytes, IL-1 β , photoreceptors, glutamate