



Maladie de Parkinson et DMLA : y a-t-il un lien ?

Thibaud Mathis

► To cite this version:

Thibaud Mathis. Maladie de Parkinson et DMLA : y a-t-il un lien ?. Biologie moléculaire. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1329 . tel-03534234

HAL Id: tel-03534234

<https://theses.hal.science/tel-03534234>

Submitted on 19 Jan 2022

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.

N°d'ordre NNT :
2020LYSE1329



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N°205
(Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences – Santé)

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Soutenue publiquement le 11/12/2020, par :
Thibaud MATHIS

Maladie de Parkinson et DMLA : Y a-t-il un lien ?

Devant le jury composé de :

Pr. Gilles RODE
Pr. Stéphanie BAILLIF
Pr. Isabelle MEUNIER
Pr Catherine CREUZOT-GARCHER
Pr. Przemyslaw SAPIEHA
Pr. Laurent KODJIKIAN
Dr. Florian SENNLAUB

Université Lyon 1
Université Nice
Université Montpellier
Université Bourgogne
Université Montréal
Université Lyon 1
Université Paris

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinateur
Co-directeur
Co-directeur

A Sophie, Alice & Hugo

Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

TITRE : Maladie de Parkinson et DMLA : Y a-t-il un lien ?

RESUME

La dégénérescence liée à l'âge (DMLA) néovasculaire est l'une des causes majeures de perte de vision, malgré une thérapie répétée par injection intravitréenne d'anti-VEGF qui constitue un fardeau considérable pour les patients, les ophtalmologistes et le système de santé. Une étude de cohorte rétrospective sur plusieurs millions de patients aux États-Unis a retrouvé que les patients parkinsoniens, traités par la L-DOPA avaient un âge de diagnostic de DMLA néovasculaire significativement plus tardif que les patients non traités. Grâce à l'utilisation d'un modèle murin de Parkinson par intoxication au MPTP, et d'un modèle murin de DMLA néovasculaire induite par phototraumatisme laser, en association avec le traitement standard de la maladie de Parkinson, nous avons montré qu'un traitement par L-DOPA induit une augmentation de la signalisation du récepteur à la dopamine D2, responsable d'une inhibition de la néovascularisation choroïdienne. Ces résultats apportent une explication à une épidémiologie intrigante. Poursuivant les travaux sur les récepteurs de la dopamine dans nos modèles murins, nous avons montré que des agonistes systémiques du récepteur D2 provoquaient une diminution de la néovascularisation. Ce comportement pourrait constituer une thérapie efficace pour réduire le besoin d'injections d'anti-VEGF chez les patients atteints de DMLA néovasculaire.

TITLE : Parkinson disease and AMD : Is there a link ?

ABSTRACT

Neovascular age-related macular degeneration (nAMD) remains a major cause of visual impairment, despite the continuous repeated intravitreal administration of anti-VEGF therapies that puts a considerable burden on patients, ophthalmologists and health care systems. A retrospective cohort of several million of patients in US found that L-DOPA treated parkinsons disease (PD) patients have a significantly delayed age of onset for nAMD. Using MPTP-induced PD- and laser-induced nAMD- mouse models in combination with the standard PD treatment of L-DOPA / DOPA-decarboxylase inhibitor, we here demonstrate that an L-DOPA treatment-induced increase of dopamine receptor 2 (DR2) signaling, and not the PD itself, is likely responsible for the inhibition of choroidal neovascularization. While explaining an intriguing epidemiological observation, our findings show that systemic DR2 agonists might constitute a much sought after therapy to reduce the need for anti-VEGF therapy in nAMD patients.

MOTS CLES

Angiogenèse ; dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) ; dopamine ; épithélium pigmentaire rétinien ; L-DOPA ; maladie de Parkinson ; monocytes ; néovascularisation choroïdienne

KEYWORDS

age-related macular degeneration (AMD) ; Angiogenesis ; choroidal neovascularization ; dopamine ; L-DOPA ; Parkinson disease ; monocytes ; retinal pigment epithelium.

LABORATOIRES D'ACCEUIL

Équipe I2B « Interactions Biologiques et Biomatériaux »

MATEIS UMR 5510

INSA-Lyon / Université Lyon 1

Site de la Buire, Bâtiment B

7 rue Guillaume Paradin – 60372 LYON Cedex 08

FRANCE

Équipe S14 « Inflammation, dégénérescence et remodelage vasculaire dans les pathologies rétiniennes »

Institut de la Vision UMR S 968 Inserm

Sorbonne Université / CHNO des Quinze-Vingts

17 rue Moreau – 75012 PARIS

FRANCE

REMERCIEMENTS

Pr José Alain SAHEL & Pr Jérôme CHEVALIER : Je vous remercie non seulement de m'avoir ouvert les portes de vos laboratoires, mais aussi de m'avoir donné les moyens de mener à bien mes projets de recherches.

A mes directeurs de thèse :

Pr Laurent KODJIKIAN : Merci de m'avoir guidé sur le chemin de la recherche dès mes premiers pas en Ophtalmologie. Ton apprentissage de la médecine, mais aussi de la démarche scientifique m'ont permis d'accomplir mes projets. Merci de ta confiance et d'avoir encadré ce travail de thèse. Ce n'est que le début et l'aventure continue.

Dr Florian SENNLAUB : Merci de m'avoir accueilli dans ton équipe à 2 reprises. Ce fut pour moi une véritable révélation et ma vision de l'Ophtalmologie, de la Science et de la Médecine a été à chaque fois transformée. Merci d'avoir accepté d'encadrer ce travail de thèse. Trouve ici l'expression de ma plus sincère gratitude et admiration.

A mes collègues :

Aux **Dr Laurent GREMILLARD, Dr Claire GAILLARD, Sandra BALVAY** et **Dalila TIDADINI** : Votre accueil au sein de l'équipe I2B et votre bonne humeur constante m'ont donné encore plus envie de continuer avec vous mes projets de recherche. Ne changez rien !

Au **Dr Stéphane HUNOT** pour m'avoir ouvert les portes de l'Institut de la Moelle et du Cerveau et partagé ses immenses connaissances sur la maladie de Parkinson. Sans ton aide, ce travail n'aurait jamais été aussi complet.

Aux **Dr Cécile DELARASSE, Dr Xavier GUILLONNEAU** et **Dr Olivier GOUREAU** pour votre disponibilité et votre aide précieuse dans mes projets.

A **Sébastien AUGUSTIN** sans qui l'ensemble de ce travail aurait été bien plus compliqué à mener. Probablement le meilleur *Lab Manager* que je connaisse... même à distance ! Merci pour ton aide précieuse à l'accomplissement de nos projets.

Aux post-Docs **Dr Michael HOUSSET & Dr Christophe ROUBEIX** pour leurs enseignements de haute qualité et leur engagement tout au long de mes projets. Vous m'avez fait partager votre passion de la recherche ainsi que votre rigueur scientifique.

A mes co-thésards **Dr Fanny BEGUIER & Guillaume BLOT** pour leurs partages d'expérience ainsi que leurs conseils avisés.

A **Marie DARCHE, Lucile VIGNAUD et Caroline NOUS** pour leur aide sur des manip trop techniques pour mes mains inexpérimentées.

Au **Pr Philippe DENIS** pour son soutien ainsi que sa confiance permanente dans mes projets. Merci de m'avoir accueilli dans votre équipe.

A **Marion BRICOUT & Olivier LORIA**, mes 2 premiers étudiants au laboratoire. J'espère continuer avec vous notre aventure Lyonnaise.

Au **Dr Christelle SZATANEK** pour tous nos projets de recherche clinique et pour son soutien en toute circonstance !

A **ma Famille** qui m'a accompagné, supporté et encouragé : ce travail est pour vous.

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
MOTS CLES	2
LABORATOIRES D'ACCEUIL	3
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	6
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES ARTICLES	10
ABBREVIATIONS	11
INTRODUCTION GENERALE	12
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	14
PARTIE A. DMLA ET DMLA NEOVASCULAIRE	15
I- CLINIQUE	15
1.1 Introduction	15
1.2 Diagnostic	16
1.3 Épidémiologie	20
1.4 Facteurs de risque	22
1.5 Traitements	27
II- L'ANGIOGENESE	30
2.1 Physiopathologie	30
2.2 Les médiateurs de l'angiogenèse	34
III- MODELES ANIMAUX ET CELLULAIRES DE DMLA NEOVASCULAIRE	50
3.1 Néovaisseaux induits par laser	50
3.2 Néovaisseaux induits par traumatisme chirurgical	52
3.3 Néovaisseaux induits par modèles transgéniques de souris	52
3.4 Culture de cellules endothéliales et explants choroïdiens	53
3.5 Organoïdes de rétine	54
PARTIE B. DOPAMINE & MALADIE DE PARKINSON	55
I- LA DOPAMINE	55
1.1 Introduction	55
1.2 Synthèse de la Dopamine	55
1.3 Récepteurs de la Dopamine	58
1.4 Voies dopaminergiques cérébrales	61
II. ROLE DE LA DOPAMINE RETINIENNE	64
2.1 Sécrétion de la Dopamine	64
2.2 Croissance de l'œil	66
2.3 Rythme circadien	67
2.4 Modulation du message visuel	70
2.5 Phagocytose	70
III. MALADIE DE PARKINSON	72
3.1 Signes cliniques	73
3.2 Étiologies	74

3.3 Physiopathologie	75
3.4 Traitement	78
3.5 Modèles animaux de maladie de parkinson	81
PARTIE C- LIEN ENTRE MALADIE DE PARKINSON ET DMLA	88
I- MALADIE DE PARKINSON ET ALTERATION RETINIENNE	88
1.1 Modification de l'activité électrique rétinienne	88
1.2 Modification de l'architecture rétinienne in vivo	88
1.3 Présence d' α -synucléine dans la rétine	90
II- MALADIE DE PARKINSON ET INFLAMMATION	92
III- LA DOPAMINE : LIEN ENTRE PARKINSON ET DMLA ?	94
2.1 Dopamine et angiogenèse	94
2.2 Dopamine et inflammation	95
IV- ÉTUDES EPIDEMIOLOGIQUES : Parkinson – DMLA – Dopamine	98
4.1 Lien entre maladie de Parkinson et la DMLA	98
4.2 Lien entre L-DOPA et DMLA	99
4.3 Biais des études épidémiologiques	99
OBJECTIFS	101
PARTIE EXPERIMENTALE	103
I- INTRODUCTION ET PLAN EXPERIMENTAL D'ENSEMBLE	104
II- EXPLORATION DE LA VOIE INFLAMMATOIRE	106
2.1 Développement d'un modèle in vitro de co-culture EPR – Monocytes (Articles 1 et 2)	106
ARTICLE 1 : Les monocytes activés résistent à leur élimination par l'EPR et dérégulent l'expression d'OTX-2 via le TNFα	109
ARTICLE 2 : L'exposition chronique au TNFα induit une dédifférenciation des cellules d'EPR	119
2.2 Effet de la L-DOPA sur l'inflammation sous rétinienne (Expérimentations non publiées)	130
III- EXPLORATION DE L'ANGIOGENESE (Article 3)	135
3.1 La L-DOPA inhibe l'angiogenèse choroïdienne de manière indépendante	135
3.2 La décarboxylation de la L-DOPA est nécessaire pour inhiber l'angiogenèse	136
3.3 L'activation du récepteur D2 est nécessaire pour inhiber l'angiogenèse choroïdienne	137
ARTICLE 3 : Le traitement des patients atteints de la maladie de Parkinson par L-DOPA inhibe la néovascularisation choroïdienne dans la DMLA via l'activation du récepteur dopaminergique D2	138
IV- DISCUSSION	168
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	171
BIBLIOGRAPHIE	172
ANNEXES- AUTRES TRAVAUX SCIENTIFIQUES DANS LE DOMAINE	199

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Grille d'Amsler
- Figure 2 :** Fond d'œil de DMLA à différents stades
- Figure 3 :** Imagerie multimodale d'une DMLA néovasculaire
- Figure 4 :** Différents types de néovaisseaux maculaires
- Figure 5 :** Prévalence de la DMLA selon la forme précoce et tardive
- Figure 6 :** Gestion des produits de dégradation des disques externes des photorécepteurs
- Figure 7 :** Immunofluorescence des phagocytes mononucléés sur coupe de rétine humaine
- Figure 8 :** Diminution de l'incidence de la cécité selon le cadre étiologique et l'année
- Figure 9 :** Mécanismes généraux d'angiogenèses
- Figure 10 :** Maturation vasculaire faisant suite à l'angiogenèse
- Figure 11 :** Rôle du facteur de transcription HIF en fonction de la présence d'oxygène
- Figure 12 :** Types de VEGF et leurs récepteurs VEGFR respectifs
- Figure 13 :** Rôle du VEGF-B dans la stimulation du VEGFR-2
- Figure 14 :** Différents types d'anticorps ciblant le VEGF-A.
- Figure 15 :** VEGF-Trap
- Figure 16 :** Modèle de néovascularisation induite par traumatisme laser
- Figure 17 :** Modèle d'explants choroïdiens de souris
- Figure 18 :** Schématisation d'une molécule de dopamine
- Figure 19 :** Voie de synthèse de la dopamine
- Figure 20 :** La synapse dopaminergique
- Figure 21 :** Voies de dégradation de la dopamine
- Figure 22 :** Récepteur à la dopamine caractéristique des récepteurs couplés aux protéines G
- Figure 23 :** 2 types de récepteurs à la dopamine.
- Figure 24 :** Voies de projection des neurones dopaminergiques
- Figure 25 :** Schématisation d'une coupe histologique de la rétine
- Figure 26 :** Neurones dopaminergiques réiniens.
- Figure 27 :** Action de la dopamine sur la croissance oculaire
- Figure 28 :** Cycle circadien dans la rétine : rôle de la dopamine et de la mélatonine
- Figure 29 :** Localisation de la substance noire et de la *pars compacta*
- Figure 30 :** Perte en cellules dopaminergiques lors de la maladie de Parkinson
- Figure 31 :** Mauvais repliement de l' α -synucléine et formation d'agrégats intracytoplasmiques
- Figure 32 :** Rôle des inhibiteurs de la DDC périphérique en association avec la levodopa
- Figure 33 :** Schématisation d'une molécule de 6-OHDA.
- Figure 34 :** Mécanisme d'action de la 6-OHDA.
- Figure 35 :** Mécanisme d'action du MPTP
- Figure 36 :** Segmentation des couches réiniennes sur l'OCT
- Figure 37 :** Schématisation des modifications réiniennes associées à la maladie de Parkinson
- Figure 38 :** Action de la dopamine sur des cellules lymphocytaires T en repos ou activés
- Figure 39 :** Co-culture EPR-Mos traités par différentes concentrations de L-DOPA
- Figure 40 :** Modèle d'inflammation sous réinienne induite par une illumination de 4 jours.
- Figure 41 :** Modèle d'induction d'une néovascularisation par laser chez les souris.
- Figure 42 :** Modèle d'explant choroïdien.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification de la DMLA

Tableau 2 : Les 5 récepteurs à la dopamine répartis en 2 sous-familles

Tableau 3 : Propriété pharmacologique des sous-types des récepteurs à la dopamine

Tableau 4 : Comparaison des modes d'intoxication au 6-OHDA et MPTP

LISTE DES ARTICLES

Article 1 :

Mathis T, Housset M, Eandi C, Beguier F, Touhami S, Reichman S, Augustin S, Gondouin P, Sahel JA, Kodjikian L, Goureau O, Guillonnet X, Sennlaub F. Activated monocytes resist elimination by retinal pigment epithelium and downregulate their OTX2 expression via TNF- α . **Aging Cell** 2017.16(1):173-182.

Article 2 :

Touhami S, Beguier F, Augustin S, Charles-Messance H, Vignaud L, Nandrot EF, Reichman S, Forster V, **Mathis T**, Sahel JA, Bodaghi B, Guillonnet X, Sennlaub F. Chronic exposure to tumor necrosis factor alpha induces retinal pigment epithelium cell dedifferentiation. **J Neuroinflammation** 2018.15(1):85.

Article 3 :

Mathis T, Baudin F, Augustin A, Bricout M, Roubeix C, Mariet AS, Blot G, Vignaud L, Nous C, Kodjikian L, Mauget-Faÿsse M, Sahel JA, Guillonnet X, Delarasse C, Creuzot-Garcher C, Hunot S, Sennlaub F. L-DOPA treatment of Parkinson patients inhibits choroidal neovascularization in age related macular degeneration through dopamine D2 receptor activation. En préparation

Article 4 (Annexe) :

Beguier F, Housset M, Roubeix C, Augustin S, Zagar Y, Nous C, **Mathis T**, Eandi C, Benchaboune M, Drame-Maigné A, Carpentier W, Chardonnet S, Touhami S, Blot G, Conart JB, Charles-Messance H, Potey A, Girmens JF, Pâques M, Blond F, Leveillard T, Koertvely E, Roger JE, Sahel JA, Sapieha P, Delarasse C, Guillonnet X, Sennlaub F. The 10q26 risk haplotype of age-related macular degeneration aggravates subretinal inflammation by impairing monocyte elimination. **Immunity** 2020.53(2):429-441.

ABBREVIATIONS

AGE : *Advanced glycation end products*
AMM : Autorisation de mise sur le marché
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ATP : Adénosine triphosphate
BHE : Barrière hémato-encéphalique
BHR : Barrière hémato-rétinienne
CFH : Facteur H du complément
COMT : Catécholamine-O-méthyltransférase
DAT : *Dopamine transporter*
DDC : DOPA-décarboxylase
DMLA : Dégénérescence maculaire liée à l'âge
DOPAC : Acide dihydroxyphénylacétique
EPO : Érythropoïétine
EPR : Épithélium pigmentaire rétinien
ERG : Électrorétinogramme
FGF : *Fibroblast growth factor*
GPCR : Récepteurs couplés aux protéines G
HIF : *Hypoxia inducible factor*
HUVEC : *Human umbilical vein endothelial cell*
HCEC : *Human choroidal endothelial cell*
HVA : Acide homovanillique
ICG : Indocyanine
iPS : *induced pluripotent stem cells*
KO : *Knout-out*
L-DOPA : Levodopa
LPS : Lipopolysaccharide
MAO : Monoamine-oxydase
MC : Cellules microgliales
Mf : Macrophages
MMP : Métalloprotéinase
Mos : Monocytes
MPTP : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NRP : Neuropilin
NAT : *Noradrenaline transporter*
NVC : Néovascularisation choroïdienne
OCT : *Optical coherence tomography*
6-OHDA : 6-hydroxydopamine
PEDF : *Pigment epithelium-derived factor*
PIGF : *Placental growth factor*
PM : Phagocyte monocléé
ROI : *Reactive oxygen intermediates*
ROS : *Reactive oxygen species*
TH : Tyrosine hydroxylase
VEGF : *Vascular endothelial growth factor*
VMAT : *Vesicular monoamine transporter*

INTRODUCTION GENERALE

Les maladies neurodégénératives représentent un groupe d'affections se traduisant par une altération du fonctionnement des cellules nerveuses pouvant conduire à la mort cellulaire. Parmi ces affections, la maladie de Parkinson est l'une des plus courantes, touchant 1 à 2% de la population de plus de 60 ans, la définissant ainsi comme une maladie neurodégénérative liée à l'âge. Le déficit en dopamine explique les principaux signes cliniques de la maladie, et un traitement par levodopa (L-DOPA), le précurseur de la dopamine qui passe la barrière hémato-encéphalique (BHE), permet de réduire la symptomatologie.

De la même manière la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est l'une des principales causes de perte d'acuité visuelle chez les patients âgés dans les pays industrialisés. Cette maladie se traduit par une altération progressive des photorécepteurs rétiniens, premiers neurones de la voie visuelle, et de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) son tissu de soutien. Cette maladie peut provoquer une atrophie rétinienne et/ou une néovascularisation choroïdienne qui marquent l'évolution tardive de la maladie. Ainsi cette maladie oculaire peut aussi rentrer dans le cadre des neurodégénérescences liées à l'âge. Malgré les évolutions récentes permettant de proposer des injections intra-vitréennes d'anti-*vascular endothelial growth factor* (VEGF) aux patients présentant une évolution néovasculaire, aucun traitement n'est disponible pour stopper le processus évolutif de la dégénérescence rétinienne. De plus, le traitement anti-angiogénique n'est que suspensif au prix de nombreuses injections.

Plusieurs études de cohortes rétrospectives de grande ampleur, ont évalué les liens épidémiologiques qui pourraient exister entre ces 2 maladies neurodégénératives. L'avantage de ces études sur base de données est l'exploitation de plusieurs milliers voire millions de dossiers informatisés de patients, qui ne serait pas envisageable dans une étude prospective classique. Ces analyses sont donc d'un intérêt majeur lorsque les maladies étudiées ont une prévalence limitée dans la population. Par contre, du fait des nombreux biais rétrospectifs de ces analyses sur données, les résultats de ces études ne peuvent qu'indiquer des pistes de recherches pour des analyses plus ciblées. Ainsi, certaines études ont montré un lien épidémiologique entre ces 2 maladies, avec une augmentation de l'incidence de la maladie de Parkinson chez des patients atteints de DMLA néovasculaire. Par ailleurs, une autre étude a montré une relation inverse entre la prise de L-DOPA et la DMLA, notamment pour sa forme néovasculaire. Néanmoins, aucune de ces études n'a pris en compte la maladie de Parkinson ou

son traitement de manière indépendante. Cela est lié au fait que la maladie de Parkinson et le traitement par L-DOPA sont pratiquement indissociables rendant impossible une analyse séparée.

De nombreuses observations histologiques ont montré le rôle d'une inflammation non contrôlée dans les stades précoces de ces maladies, alors même qu'elle atteint un espace dit de « privilège immun » médié par des signaux immunosuppresseurs forts et une barrière hémato-rétinienne (BHR) ou BHE fortement sélective. Ainsi, certains facteurs de risques pro-inflammatoires communs ont été retrouvés dans ces 2 pathologies pouvant expliquer le lien épidémiologique. D'autre part, les traitements spécifiques de la maladie de Parkinson sont administrés par voie systémique et peuvent ainsi jouer un rôle sur le tissu oculaire.

Le but de cette thèse est d'investiguer les mécanismes physiopathologiques intervenant dans la DMLA et la maladie de Parkinson, ainsi que les voies thérapeutiques actuelles.

Dans une première partie nous ferons le point sur les différents éléments moléculaires et cliniques propres à ces 2 pathologies. Dans une deuxième partie nous étudierons les liens possibles entre ces pathologies et leurs traitements respectifs.

Dans la partie expérimentale, nous développerons les outils mis en place pour comprendre les mécanismes biologiques spécifiques à chaque pathologie et les processus qui sont susceptibles de les lier, en nous focalisant sur les processus inflammatoires et angiogéniques identifiés dans chacune d'elle. Nous développerons tout d'abord un modèle innovant de co-culture mettant en contact monocytes et EPR, mimant *in vitro* les phénomènes inflammatoires sous-jacents à la DMLA. Après avoir validé ce modèle, nous avons étudié l'influence de la L-DOPA et la dopamine afin d'évaluer leurs rôles dans la modulation de la réponse immunitaire. Enfin, à l'aide de modèles murins de maladies de Parkinson et de DMLA néovasculaires, nous avons pu investiguer de manière séparée le rôle du récepteur D2 et l'implication de la maladie de Parkinson et de la L-DOPA sur l'angiogenèse choroïdienne.

L'ensemble de ces résultats ont permis de mettre en évidence la possibilité d'un mécanisme d'interaction cellulaire nouveau permettant d'envisager une voie thérapeutique originale dans la prise en charge de la DMLA néovasculaire.

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE A. DMLA ET DMLA NEOVASCULAIRE

I- CLINIQUE

1.1 Introduction

La DMLA est une maladie invalidante, qui évolue vers la perte de vision du patient et une diminution de sa qualité de vie [1–3]. La DMLA affecte un nombre important de personnes du fait du vieillissement de la population, mais aussi en raison des modifications des habitudes de vie (tabagisme, alimentation, obésité...). En France, on estime qu'environ 2 000 000 de personnes sont atteintes de DMLA tous stades confondus [3]. C'est un problème de santé publique majeur et la principale cause de cécité irréversible dans les pays industrialisés [4].

La DMLA se caractérise par une dégénérescence progressive de la zone centrale de la rétine qui permet la vision détaillée. Cette zone appelée macula est responsable de la discrimination des hautes fréquences spatiales (lecture), de la vision des couleurs et du champ visuel central. La perte d'acuité visuelle, secondaire à la survenue d'une DMLA, entraîne une altération importante de la qualité de vie des patients. D'une forme précoce puis intermédiaire, la DMLA peut évoluer vers deux formes tardives : la forme atrophique, qui progresse lentement, et la forme exsudative ou néovasculaire, d'évolution plus rapide. Le traitement de la DMLA exsudative s'est spectaculairement amélioré ces dernières années, grâce à la mise au point d'une thérapie anti-angiogénique (ciblant le VEGF) empêchant la formation de néovaisseaux, mais ne permettant pas de guérir de la maladie [5–7]. En effet, bien que les anti-VEGF soient très efficaces, ils nécessitent des injections multiples et fréquentes dans le temps afin de contrôler la maladie [8,9]. De plus, la plupart des patients ne récupèrent jamais leur précédente vision en raison de cicatrices rétinienne et choroïdienne qui surviennent durant l'évolution du processus néovasculaire [10,11].

Les patients atteints de DMLA atrophique ne bénéficient pas des mêmes avancées thérapeutiques. Bien que d'évolution plus lente, la DMLA atrophique demeure de mauvais pronostic et peut parfois se compliquer de néovaisseaux, justifiant donc une surveillance rapprochée. Lorsque la baisse d'acuité visuelle devient invalidante, la seule prise en charge de la DMLA atrophique repose alors sur la rééducation basse-vision et les systèmes optiques (lunettes, loupes, agrandisseur d'image, ...).

A ce jour, aucune thérapeutique préventive n'a été validée dans la DMLA, car les facteurs de risques de développer la maladie ne sont pas encore bien connus à l'exception de l'âge [12], de certains variants génétiques [13] ou du tabagisme [14].

1.2 Diagnostic

1.2.1 Examen clinique et paraclinique

Le diagnostic de DMLA se fait sur l'association de signes fonctionnels, cliniques et paracliniques. Cependant, il peut parfois être établi de façon fortuite lors d'un examen systématique du fond d'œil. L'un des premiers signes fonctionnels est la baisse de l'acuité visuelle qui est mesurée par la Meilleure Acuité Visuelle Corrigée. En pratique, les métamorphopsies (lignes déformées) et la présence d'un scotome central (tâche noire) sont recherchés par la grille d'Amsler (**Figure 1**).

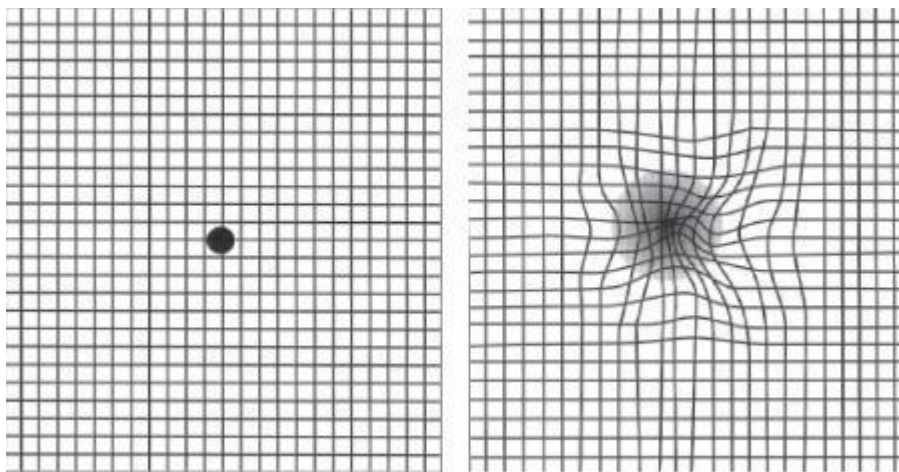


Figure 1 : grille d'Amsler normale (gauche), représentation de métamorphopsies et d'un scotome central (droite).

L'examen du fond d'œil peut retrouver des drusen, des altérations de l'EPR ou encore une atrophie. Des signes indirects marquant la néovascularisation dans le cas d'une DMLA exsudative (hémorragies) peuvent aussi être mis en évidence. Il est parfois possible de visualiser les néovaisseaux directement, sous forme d'une lésion grisâtre sous la rétine (**Figure 2**).

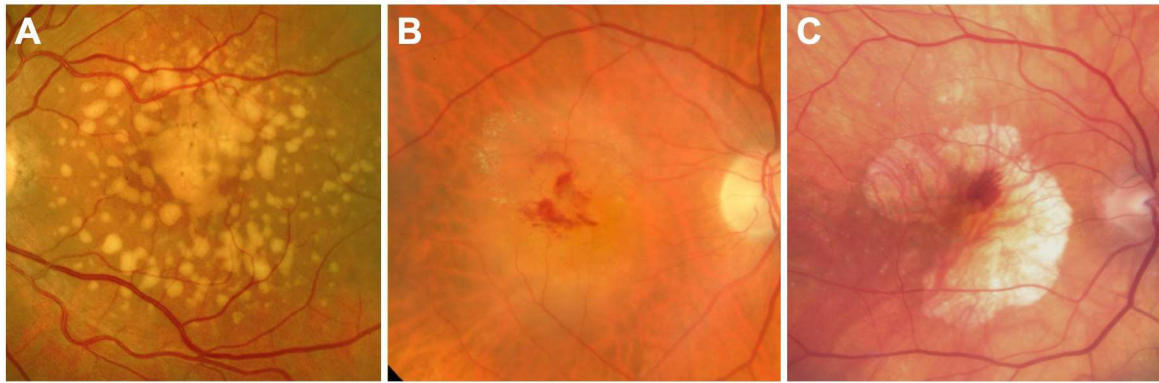


Figure 2 : Fond d'œil de DMLA à différents stades. A. Drusen maculaires ; B. Néovaisseau maculaire ; C. Atrophie géographique (Photographies : services d'Ophtalmologie de l'hôpital de la Croix-Rousse, HCL, Lyon).

Mais c'est véritablement l'avènement de l'imagerie multimodale qui a permis d'améliorer le diagnostic de la DMLA, le suivi et l'évaluation de l'efficacité thérapeutique. Ainsi l'apport de la tomographie en cohérence optique (*optical coherence tomography*, OCT) a permis de localiser précisément in vivo les lésions visualisées au fond d'œil avec une bonne corrélation avec l'histologie de la rétine. L'angiographie à la fluorescéine et au vert d'indocyanine (ICG) confirme le diagnostic de néovaisseaux choroïdiens dans le cas de la DMLA exsudative (**Figure 3**).

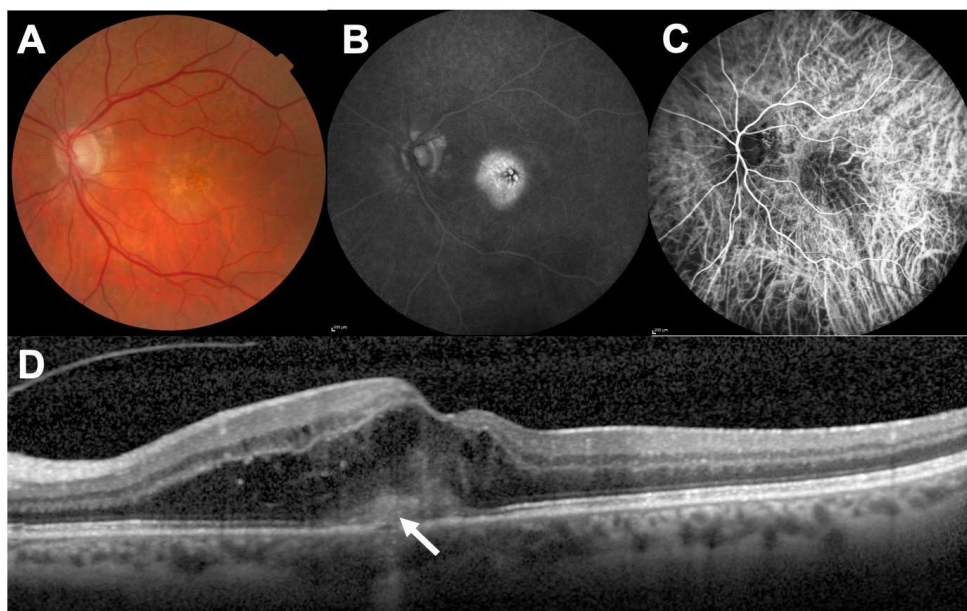


Figure 3 : Imagerie multimodale d'une DMLA néovasculaire. A. Rétinophotographie montrant une membrane grisâtre maculaire ; B. Angiographie à la fluorescéine démontrant une diffusion du produit de contraste ; C. Angiographie à l'ICG montrant un lacis néovasculaire maculaire. D. OCT montrant le néovaisseau pré-rétinien (flèche) associé à un syndrome exsudatif. (Photographies : services d'Ophtalmologie de l'hôpital de la Croix-Rousse, HCL, Lyon).

1.2.2 Différentes formes

La classification de référence de la DMLA est celle de l'*Age-Related Eye Disease Study* (AREDS) modifiée en 2013 (**Tableau 1**) [15]. Elle a été réalisée à partir des données d'une étude prospective, monocentrique et randomisée, menée sur 3 557 sujets aux Etats-Unis entre 1992 et 1998 à l'initiative du *National Eye Institute* [16].

Tableau 1 : Classification de la DMLA (d'après Ferris *et al.* [15]).

Stade de la DMLA	Définition
DMLA précoce	Présence de Drusen moyens ($> 63\mu\text{m}$ et $\leq 125\mu\text{m}$) Absence d'altérations de l'EPR
DMLA intermédiaire	Présence de larges Drusen ($>125\mu\text{m}$) et/ou Présence d'altérations de l'EPR
DMLA tardive exsudative	Présence de néovaisseaux
DMLA tardive atrophique	Présence d'atrophie

1.2.2.1 La DMLA précoce et la DMLA intermédiaire

Dans la forme précoce, les premiers signes fonctionnels sont la diminution de la vision des contrastes accompagnée d'une diminution de la vision des couleurs. Une baisse d'acuité visuelle minime à modérée peut également être associée à ces premiers signes fonctionnels. Le fond d'œil peut mettre en évidence des altérations focales maculaires de l'EPR sous forme d'hypopigmentation ou d'hyperpigmentation. Le signe clé et quasi pathognomonique de la DMLA précoce est l'apparition de lésions blanc-jaunâtres sous rétinienne, ovalaires et cotonneuses appelées drusen [17]. Ces drusen correspondent à l'accumulation des déchets lipidiques de l'EPR et ils siègent dans l'espace sous-épithélial dans la membrane de Bruch [18] ou dans l'espace sous rétinien au-dessus du plan de l'EPR [19–21]. Dans la forme intermédiaire, les drusen sont plus larges ($>125\mu\text{m}$), et il peut être retrouvé au fond d'œil des altérations de l'EPR. Ces altérations peuvent prendre la forme d'hypo ou hyperpigmentation et résultent d'une dérégulation de la production de mélanine par les cellules d'EPR. L'élément déclencheur de ces altérations cellulaires serait l'accumulation de lipofuscine, composée de débris d'une phagocytose incomplète des segments externes des photorécepteurs, qui contiennent des protéines et lipides oxydés [22].

Une DMLA précoce ou intermédiaire peut évoluer vers une forme tardive qui se caractérise soit par une prolifération de néovaisseaux choroïdiens (DMLA exsudative), soit par une atrophie géographique maculaire (DMLA atrophique).

1.2.2.2 La DMLA tardive

La DMLA tardive existe sous deux formes : exsudative (humide) et atrophique (sèche). Ces 2 formes ont des profils évolutifs et fonctionnels très différents même si une forme de la maladie n'exclut pas l'apparition de la deuxième.

La DMLA exsudative

La forme exsudative est caractérisée par une angiogenèse non contrôlée qui entraîne la prolifération de néovaisseaux immatures issus de la choriocapillaire ou de la rétine et une diffusion de fluide sous et dans la rétine, favorisant la perte de fonction des cellules visuelles que sont les photorécepteurs rétiniens.

Les mécanismes moléculaires et cellulaires de cette angiogenèse ne sont que partiellement élucidés. Il s'agit d'une cascade d'événements dont le stimulus naît du déséquilibre entre facteurs pro- et anti-angiogéniques. Le VEGF est le chef de file des facteurs pro-angiogéniques [23]. On retrouve 2 types de néovaisseaux choroïdiens : les néovaisseaux choroïdiens sous-épithéliaux (type 1) et les néovaisseaux choroïdiens pré-épithéliaux (type 2), ainsi que des néovaisseaux intra-rétiniens pouvant se compliquer d'anastomose chorioretinienne (type 3) **(Figure 4)** [24]. Ils sont parfois associés entre eux dans une même lésion. La forme exsudative de la DMLA a une évolution beaucoup plus rapide que la forme atrophique. En effet, la présence de fluide sous la rétine et dans les couches rétinienne est très toxique pour les cellules composant ce tissu, provoquant une baisse d'acuité visuelle aiguë associée à des métamorphopsies.

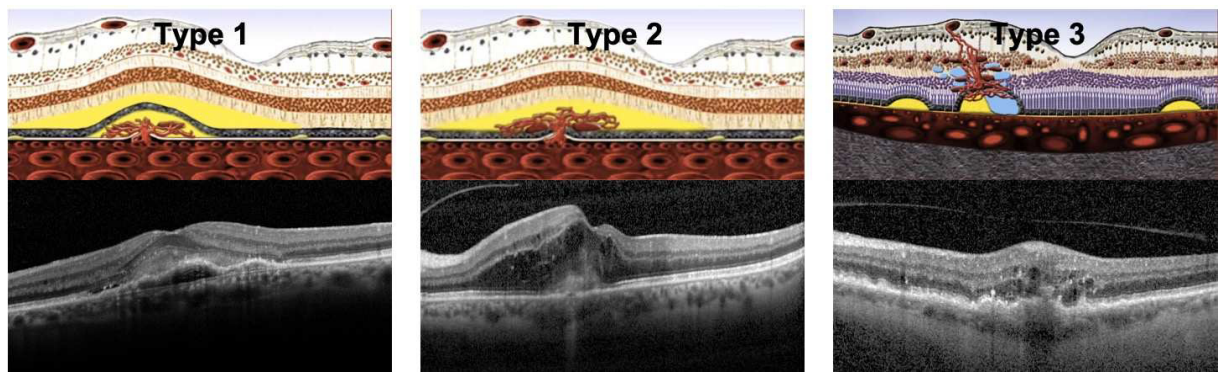


Figure 4 : Représentation schématique des différents types de néovaisseaux maculaires et examen OCT correspondant. A. Type 1; B. Type 2; C. Type 3 (Schéma issus de Freund et al. [24]; Photographies : services d'Ophtalmologie de l'hôpital de la Croix-Rousse, HCL, Lyon) .

La DMLA atrophique

La forme atrophique correspond à la mort cellulaire rétinienne en regard des cellules de l'EPR déficientes. En effet, le photorécepteur n'ayant plus de nutriments et le chromophore rétinien ne se recyclant plus, cela va aboutir à l'atrophie de cette cellule visuelle. Il va en résulter une plage atrophique dont l'évolution est inexorable mais progressivement lente. On retrouve habituellement une symétrie de l'étendue et de la localisation des plages d'atrophie entre les 2 yeux. Le centre de la fovéa est généralement respecté jusqu'aux stades les plus tardifs. Les signes fonctionnels sont le plus souvent une baisse de la sensibilité au contraste, une gêne dans la vitesse de lecture, une limitation dans le champ visuel à type de scotome central (tâche noire) et une diminution de la vision en faible éclaircissement. Il semble y avoir deux types de présentation de l'atrophie rétinienne : une lésion ronde unique à bord net associée à la présence de matériel, ou plusieurs lésions polycycliques [25].

1.3 Épidémiologie

L'âge est le principal facteur de risque de DMLA et la plupart des études montrent que l'incidence, la prévalence et la progression de toutes les formes de DMLA augmentent avec les années. Pour la DMLA précoce, elle passe de 3.5% pour le groupe d'âge 55-60 ans à 17.6% pour ceux âgés de plus de 85 ans. Concernant les stades tardifs de DMLA, ces chiffres sont de 0.1% et 9.8% respectivement [26] (**Figure 5**).

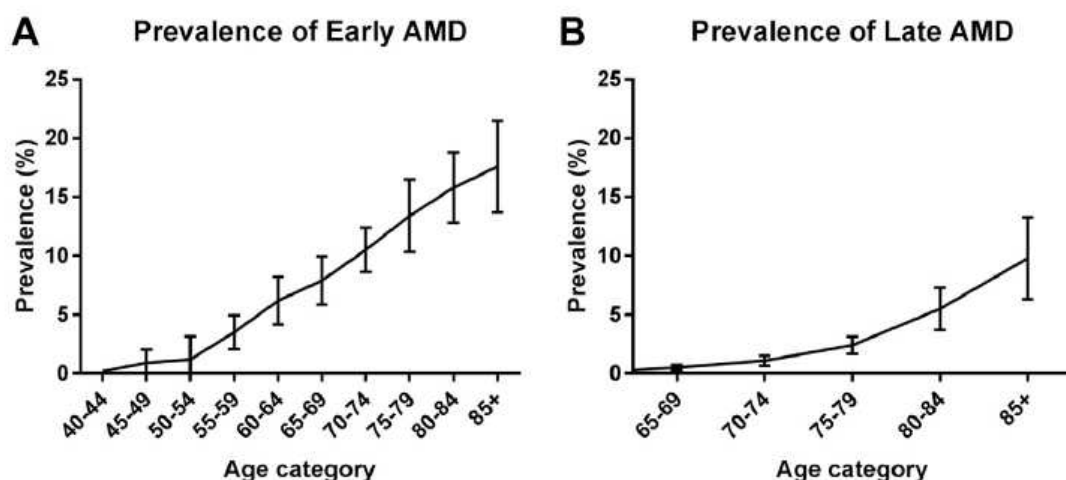


Figure 5 : Prévalence de la DMLA selon la forme précoce et tardive (adaptation de Colijn et al. [26]).

Selon l'étude EUREYE, la prévalence de la DMLA dans une population européenne de 65 ans ou plus, issue de 7 pays différents, est de 3,3 % pour l'ensemble des formes atrophiques et exsudatives, avec un rapport d'environ 2 formes exsudatives pour 1 forme atrophique, les formes mixtes étant considérées comme des DMLA exsudatives [1].

Dans l'étude prospective française POLA (Pathologies Oculaires Liées à l'Âge), la présence d'une maculopathie liée à l'âge (DMLA précoce dans la nouvelle classification [15]) confère un *odds ratio* de 78 (14.6–420.1; IC 95 % ; $P < 0.0001$) de développer une DMLA à trois ans [2]. La DMLA précoce constitue donc un enjeu important du dépistage, puisqu'elle allie l'absence de symptômes et un fort pouvoir pronostique. Ces anomalies précoces sont fréquentes dans la population âgée. Ainsi, dans l'étude EUREYE, 36,5 % des participants à l'étude comportaient au fond d'œil des drusen séreux isolés de 63µm à 125µm ou des anomalies pigmentaires isolées [1]. Outre-Atlantique, dans une autre étude épidémiologique, la Beaver Dam Study (USA, Wisconsin), la prévalence des drusen séreux de 125µm ou plus est de 24 % chez les personnes de 75 ans ou plus. Dans une analyse groupée des principales études dans les pays industrialisés sur des populations caucasiennes, la prévalence des drusen de 125µm ou plus est d'environ 1 % à 40 ans, 10 % à 70 ans et 25 à 30 % chez les plus de 80 ans.

1.4 Facteurs de risque

La DMLA est une affection polygénique et environnementale. En dehors de l'âge [12], le sexe féminin est aussi reconnu comme étant un facteur de risque non modifiable de développer une DMLA [27,28]. De nombreuses études ont montré l'importance de la prédisposition génétique dans l'apparition de la maladie. Plusieurs gènes de prédisposition à la DMLA ont été identifiés : le Facteur H du Complément (CFH), le gène *Age-Related Maculopathy Susceptibility 2 / High-Temperature Requirement A Serine Peptidase 1 (ARMS2/HTRA1)* ou encore le gène de l'apolipoprotéine E (*apoE*) [13,29–31]. Leurs associations aux facteurs environnementaux participeraient au déclenchement de la maladie.

1.4.1 Stress oxydatif

Pour fonctionner normalement, la rétine consomme de l'oxygène. Les réactions mettant en jeu cette molécule s'accompagnent d'une libération de radicaux libres [32] qui, lorsqu'ils sont présents en excès, peuvent s'attaquer aux protéines, aux parois des cellules ou à l'ADN : ce phénomène est appelé stress oxydatif [33]. Le corps humain limite ces attaques en produisant des antioxydants dont l'efficacité est renforcée par ceux apportés par l'alimentation [34,35]. En captant les radicaux libres, les antioxydants sont oxydés à la place des tissus environnants. Une fois que la réaction a eu lieu entre l'antioxydant et le radical libre, les 2 molécules deviennent inactives. Avec l'âge et sous l'effet de facteurs environnementaux (UV, tabac, mode de vie) ou génétiques, le corps produit de moins en moins d'antioxydants : l'équilibre radicaux libres/antioxydants n'est alors plus respecté et les cellules peuvent être endommagées [36].

Le cycle visuel produit physiologiquement des radicaux libres oxygénés qui, du fait de leur toxicité, sont éliminés en permanence par un système antioxydant. Plusieurs enzymes, utilisant le cuivre et certaines vitamines comme les vitamines C et E, participent à ce système. Le vieillissement de la rétine va entraîner une baisse de la capacité du renouvellement et de la dégradation des produits de phagocytose au niveau de l'EPR. La nature toxique du matériel oxydé des disques des segments externes des photorécepteurs (issu d'une l'hydrolyse incomplète) pourrait endommager la membrane du phagolysosome dans l'EPR, conduisant à une fuite cytoplasmique d'enzymes lysosomales potentiellement toxiques. La majeure partie des produits issus de l'hydrolyse incomplète sont des débris membranaires ou des complexes macromoléculaires de type lipofuscine. Ces derniers sont stockés sous forme de granules de

lipofuscine ou, après réaction avec la mélanine, sous forme de granules de mélanolipofuscine [37,38]. La lipofuscine va s'accumuler dans ces cellules. Elle va être responsable d'une diminution de la capacité phagocytaire de l'EPR et de l'inhibition des enzymes protéolytiques des lysosomes [39]. Non seulement la lipofuscine est toxique par elle-même, mais elle contribue également au stress oxydatif, en tant que chromophore [22]. En effet, elle sensibilise les cellules épithéliales à la lumière bleue, provoquant la production d'oxygène singulet et de radicaux libres. Ceux-ci vont induire des réactions photo-oxydatives endommageant ces cellules et causant leur mort par apoptose [40]. Une partie des produits hydrolysés va rejoindre la membrane de Bruch et la choriocapillaire. Certains déchets peuvent être retenus dans la membrane de Bruch, provoquant des dépôts altérant son fonctionnement. A cela s'ajoute des calcifications et une accumulation de lipides entre l'EPR et la choroïde (au niveau de la membrane de Bruch) entraînant une baisse de la perméabilité de cette membrane puis une baisse des échanges entre la choriocapillaire et l'EPR. On observe de manière concomitante une raréfaction de ce lit vasculaire choroïdien entraînant à terme, une atrophie de la choroïde (Figure 6).

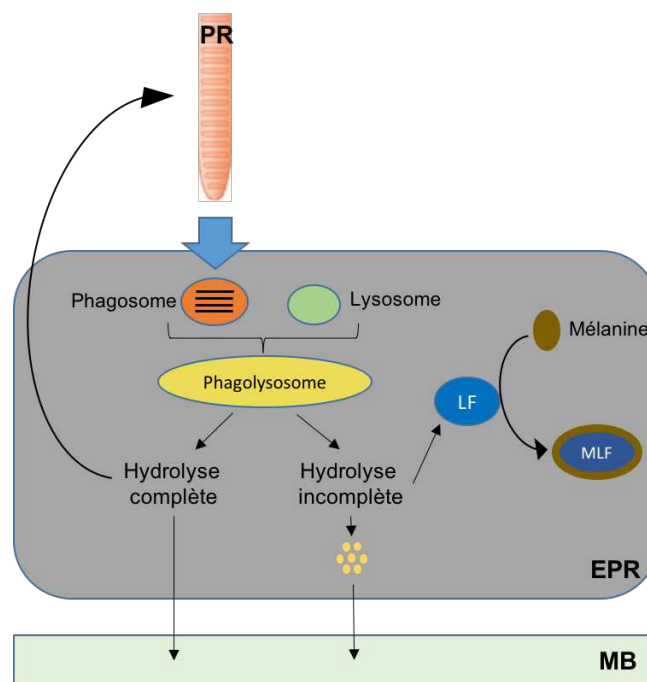


Figure 6 : Gestion des produits de dégradation des disques externes des photorécepteurs dans l'épithélium pigmentaire. Le phagosome ingéré par l'EPR va fusionner avec un lysosome afin de former un phagolysosome. Ce dernier va être hydrolysé de manière plus ou moins complète. EPR : Epithélium Pigmentaire Rétinien, MB : Membrane de Bruch, PR : Photorécepteur, LF : Lipofuscine, MLF : Mélanolipofuscine (Schéma T.Mathis).

Le stress oxydatif est donc l'un des mécanismes principaux et prépondérants des altérations rétiniennes de la DMLA dans toutes ses formes [41]. Celui-ci peut réguler l'expression de gènes

impliqués notamment dans la croissance cellulaire et dans l'apoptose [40]. Les études épidémiologiques qui se rattachent à cette théorie se sont intéressées aux marqueurs sanguins du statut antioxydant et aux conditions de vie connues pour induire un stress oxydant telles que le tabagisme et l'exposition à la lumière.

1.4.1.1 Marqueurs sanguins

Les résultats du «*Eye Disease Case-Control Study Group*» suggèrent qu'un taux sanguin élevé en antioxydants (vitamines E, vitamines C, sélénium et caroténoïdes) est associé à un risque moindre de développer une DMLA exsudative [42]. D'autres études multicentriques ont confirmé cette tendance.

En revanche, l'étude « POLA » rapporte que le statut antioxydant des patients atteints de DMLA tardives met en évidence une très forte association entre un niveau élevé de la glutathion peroxydase plasmatique (plGPx) et une augmentation de la prévalence de ces formes de DMLA. Ces résultats analytiques apparemment paradoxaux s'interprètent par le fait que l'augmentation de la plGPx serait réactionnelle à un stress oxydant dont elle représenterait le marqueur. Ce type de réaction homéostatique a été décrit dans plusieurs situations de stress oxydant [2].

1.4.1.2 Nutrition

L'alimentation est également susceptible de jouer un rôle dans le développement de la DMLA. Les essais qui ont étudié l'impact des apports alimentaires en antioxydants sont peu nombreux et discordants notamment pour l'administration de vitamines antioxydantes E et C. Toutefois les travaux du « *Eye disease Case-Control Study Group* » ont montré qu'un important apport alimentaire en caroténoïdes était associé à un moindre risque de DMLA tardive, particulièrement s'il s'agissait des caroténoïdes constituant le pigment maculaire physiologique, la lutéine et la zéaxanthine [43]. Le rapport 8 de l'AREDS 1 publié en 2001 a montré l'intérêt d'une supplémentation par vitamines et oligoéléments (bêta-carotène, vitamine C et E, Zinc) en prévention de l'évolution de la DMLA [44].

1.4.1.3 Tabagisme

Après l'âge, le tabagisme représente certainement le facteur de risque le plus important de la DMLA [14,45,46]. De nombreuses études montrent en effet que les fumeurs présentent une prévalence accrue de la maladie, particulièrement de ses formes tardives. Ces données peuvent être considérées sous l'angle du stress oxydant, sachant que le tabagisme s'accompagne d'une baisse du statut antioxydant plasmatique [47].

1.4.1.4 Exposition à la lumière

Si l'exposition au rayonnement solaire est reconnue comme un facteur de risque de la cataracte sénile, elle n'est pas considérée comme tel pour la DMLA. En effet, plusieurs études n'ont pas pu établir de façon claire une association entre cette exposition et la maladie. Cependant, certaines d'entre elles ont pu démontrer que l'exposition au spectre visible, et particulièrement au bleu, pendant de longues années pouvait être reliée au développement des formes tardives de DMLA [48]. Ces résultats sont ambigus mais n'éliminent pas le rôle de l'exposition à la lumière dans l'étiopathogénie de la DMLA [45].

1.4.2 Voie inflammatoire

Ces dernières années ont vu l'augmentation du nombre d'évidences impliquant la composante inflammatoire dans la DMLA. Des complexes immuns ont été retrouvés dans les drusen maculaires de patients présentant une DMLA : CFH, des protéines appartenant au Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) et des oligomères amyloïdes. Plusieurs études ont montré que la DMLA était associée à un polymorphisme du CFH, qui entraînerait une suractivation du système du complément [29–31,49], soulignant le rôle important des médiateurs inflammatoires dans la DMLA.

Les Cellules Microgliales (MC) sont des cellules immunitaires résidant dans le système nerveux central (SNC). Au niveau des yeux, elles sont localisées dans la rétine interne. L'espace sous rétinien, situé entre les articles externes des photorécepteurs et l'EPR est une zone de privilège immun. Il est physiologiquement dépourvu de cellules appartenant au système Phagocytaire Mononucléé (PM) : MC, monocytes (Mos), Macrophages (Mf), et cellules dendritiques [50], ces deux derniers types cellulaires dérivant des Mos. Dans la DMLA, MC, Mos et Mf ont été retrouvés activés et accumulés dans l'espace sous rétinien [50,51]. D'autre part, les fractions

C3 et C5 du complément, recrutant les neutrophiles et les Mf, ont été retrouvées dans cet espace chez des modèles murins de néovaisseaux choroïdiens. Un mécanisme similaire pourrait participer à l'inflammation rétinienne dans la DMLA [31,50–52]. Cette hypothèse est corroborée par le fait que les MC/Mf sont une importante source de cytokines et de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF [53].

L'accumulation des cellules appartenant au système PM dans l'espace sous-rétinien semble être un tournant pathologique majeur dans l'évolution de la maladie [50–52,54]. En effet, par la sécrétion de nombreuses cytokines et facteurs de croissance, les PMs vont contribuer à l'aggravation de la maladie, voire même au développement des stades précoces. Cette accumulation dans l'espace sous rétinien est le résultat de deux mécanismes étroitement intriqués :

- Le recrutement des cellules immunitaires via la sécrétion de chemokines suite à un stress tissulaire important [51].
- La sécrétion anormale de protéines augmentant la survie de ces cellules appartenant au système PMs dans un environnement normalement très restrictif en cellules immunitaires [55,56].

Cette accumulation de PMs a récemment été montrée sur des coupes de rétines humaines atteintes de DMLA atrophique par la présence dans l'espace sous rétinien de nombreux Mos recrutés de la circulation générale (Mos-CCR2+) [51]. Ce recrutement de cellules s'expliquerait par la sécrétion de la chemokine CCL2, retrouvée en plus grande quantité dans l'humeur aqueuse de patients atteints de DMLA atrophique comparé à un groupe de patients sains. Sur des modèles murins, la CCL2 était bien associée à un recrutement de Mos-CCR2+ dans l'espace sous rétinien et cette accumulation était liée à des phénotypes de DMLA atrophique [51]. Dans un deuxième temps, il a été démontré l'effet délétère de cette accumulation de Mos-CCR2+ sur des modèles cellulaires ou murins via la sécrétion de nombreuses cytokines. L'IL-1 β a ainsi été retrouvée associée avec une apoptose accrue des photorécepteurs sur des modèles murins. Son inhibition diminuerait cette mort cellulaire [57]. Sur ces mêmes modèles, le rôle de l'IL-6 sur l'augmentation de la survie des Mos-CCR2+ dans l'espace sous-rétinien a été montré comme déterminant. Cette meilleure survie s'expliquerait par la diminution de la transcription de Fas Ligand, une protéine impliquée dans l'apoptose cellulaire [55,56]. Enfin le TNF α semblerait lui aussi jouer un rôle dans la dérégulation de l'EPR sur un modèle *in vitro* de co-culture EPR/Mo-CCR2+. Cette dérégulation passerait par la diminution du facteur de transcription

OTX2, impliqué dans de nombreuses fonctions homéostatiques de la cellule, ainsi que dans le cycle de renouvellement du photopigment visuel [58,59].

En résumé, de nombreux Mos sont recrutés dans un contexte de DMLA chez la souris et chez l'homme (**Figure 7**) [50,51]. Sur des modèles cellulaires ou murins, il a été montré que les Mos sont une source importante de sécrétion de cytokines altérant soit les photorécepteurs rétiniens, soit les cellules d'EPR [50,57,60]. Ce mécanisme inflammatoire expliquerait la perte cellulaire neuronale rétinienne (photorécepteurs) et l'altération de l'EPR [57,58,60].

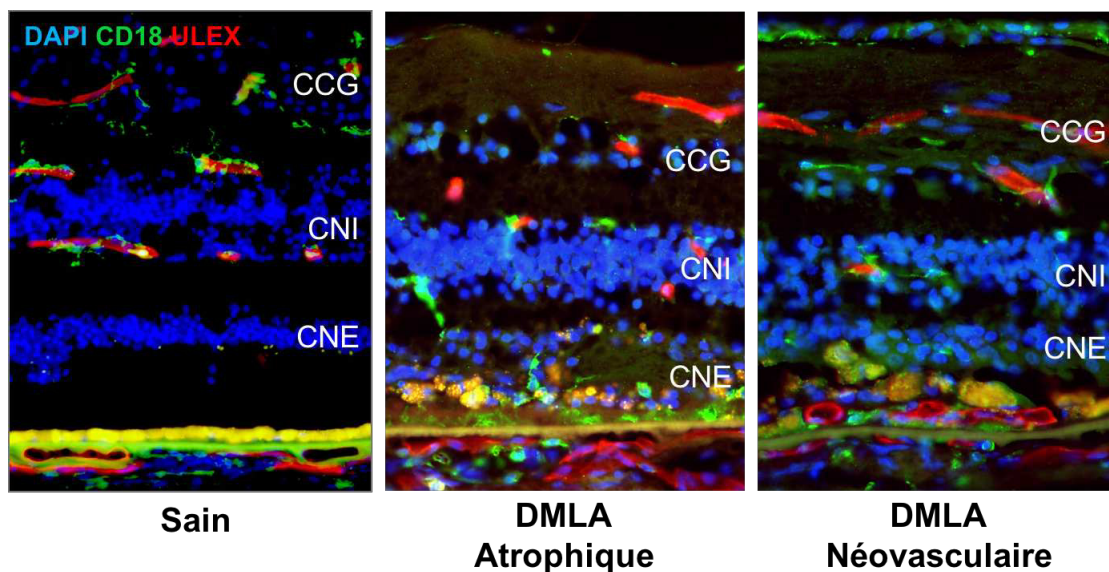


Figure 7 : Immunofluorescence des phagocytes mononucléés sur coupe de rétine humaine. Patient sain. Les couches cellulaires rétiniennes sont bien organisées, il n'y a pas de Phagocytes mononucléés (PMs) (CD18+) visibles dans l'espace sous rétinien. Patient atteint d'une DMLA atrophique. Les couches rétiniennes sont désorganisées, de nombreux PMs sont visibles, majoritairement dans l'espace sous rétinien. Aucun néovaisseau choroïdien (ULEX) n'est visible dans cet espace, confirmant le caractère atrophique de la DMLA. Patient atteint d'une DMLA néovasculaire. Des néovaisseaux sont visibles en avant de l'épithélium pigmentaire (ULEX). Quelques PMs sont visibles dans l'espace sous rétinien. CCG : Couche des cellules ganglionnaires, CNI : Couche nucléaire interne, CNE : Couche nucléaire externe. DAPI en bleu, CD18 en vert, ULEX en rouge (clichés Florian Sennlaub, institut de la vision, UPMC, Paris).

1.5 Traitements

1.5.1 Traitements préventifs

Il n'existe aucun traitement préventif efficace de la maladie ou bloquant son évolution. Cependant, l'utilisation de différents compléments alimentaires pourrait avoir un intérêt pour limiter la progression. Ainsi, l'étude AREDS 1 a montré une réduction de 25 % du risque de

progression de la DMLA d'un stade précoce à un stade tardif chez des patients supplémentés en antioxydants (vitamine C, E, bêta-carotène) et en zinc, par rapport à des patients non supplémentés, sans effet secondaire majeur [25]. Un rapport de l'AREDS a montré que le risque de développer une DMLA était inversement proportionnel aux apports alimentaires en lutéine et zéaxanthine, sur la base d'une évaluation par questionnaire alimentaire [61].

Des études épidémiologiques ont également montré une diminution du risque de DMLA chez les sujets dont l'alimentation était riche en oméga-3 [62,63]. En effet, les acides gras essentiels oméga-3 ou acides gras polyinsaturés à longue chaîne (acide docosahexanoïque - DHA ; acide eicosapentaénoïque - EPA) sont retrouvés au niveau du segment externe des photorécepteurs.

A ce jour, une association d'antioxydants est la seule supplémentation validée par l'HAS en prévention secondaire. Cette supplémentation semblerait ralentir l'évolution de la maladie, sans la guérir.

1.5.2 Traitements curatifs

1.5.2.1 La DMLA exsudative

Le traitement de la DMLA exsudative repose actuellement sur des injections intra-vitréennes (IVT) de médicaments anti-VEGF [5,6]. Le ranibizumab (Lucentis®) bénéficie de l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) depuis Janvier 2007 et du remboursement dans cette indication depuis Juin 2007, ou par bevacizumab (Avastin®) dont l'utilisation est réalisée dans le cadre d'une ATU depuis 2015. Plus récemment, des injections de VEGF-Trap ou aflibercept (Eylea®) peuvent être aussi proposées. Cette molécule agit sur l'ensemble des isoformes de VEGF-A, mais aussi sur le PlGF (*Placenta Growth Factor*). Son AMM a été obtenu en Novembre 2012.

Bien que ces traitements aient révolutionné la prise en charge et le pronostic des patients atteints de cette forme de DMLA en permettant une réduction de la cécité d'environ 50% de cette maladie (**Figure 8**) [7], leur action n'est que suspensive et ne permet pas la guérison ni la prévention de la maladie. De plus, cette thérapeutique par injection d'anti-VEGF nécessite des injections fréquentes et répétées qui sont parfois contraignantes de mise en œuvre en vraie vie. Cette chronicité de la maladie peut être difficile à supporter par le patient, le médecin, ainsi que par le système de santé [64,65].

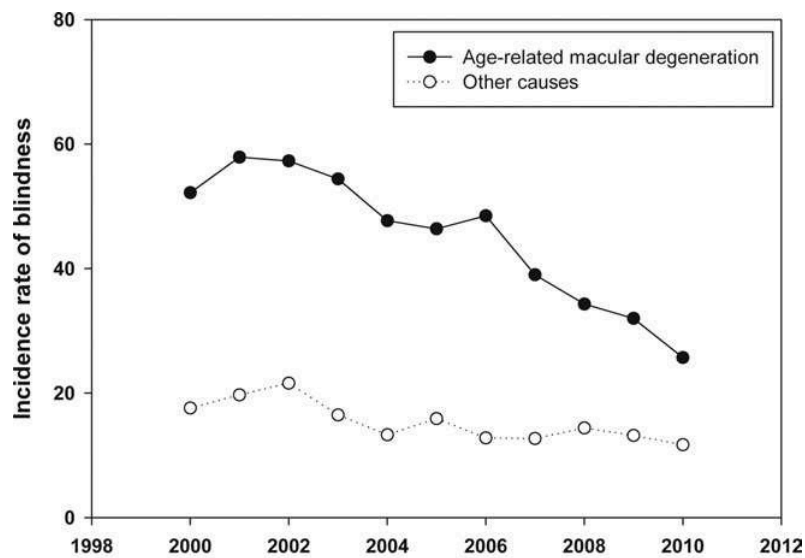


Figure 8 : Diminution de l'incidence de la cécité selon le cadre étiologique et l'année (d'après Bloch et al. [7])

1.5.2.2 La DMLA atrophique

Il n'existe actuellement pas de traitement efficace de la forme atrophique. Cependant, plusieurs études ont montré la possibilité de réduction de l'extension des plages atrophiques par des agents antioxydants (vitamine E, bêta-carotène) [66]. Des essais cliniques de phase 3, testant différentes molécules sont actuellement en cours d'inclusion ou de suivi (anti-C5 aptamer, anti-C3). Cependant, si ces nouvelles molécules avaient le potentiel de ralentir l'évolution de la maladie, elles ne pourraient pas la stopper totalement. Aucun traitement ne dispose à ce jour d'une AMM dans cette indication.

II- L'ANGIOGENESE

Le processus d'angiogenèse définit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau vasculaire préexistant [67]. Alors que les mécanismes d'angiogenèse sont très développés au stade embryonnaire, ils sont ensuite extrêmement régulés et ne s'activent que dans certains cas. Une dérégulation de ces mécanismes peut être source de pathologies, comme la DMLA, ou être un facteur de mauvais pronostic dans certaines maladies telles que les cancers. Réguler une angiogenèse anormalement haute est une voie thérapeutique ciblée de ces maladies.

2.1 Physiopathologie

2.1.1 Mécanismes généraux

Lors de l'embryogenèse, le développement de nouveaux vaisseaux fait appel aux angioblastes, les précurseurs des cellules endothéliales. Ceux-ci vont se regrouper et se différencier afin de former des vaisseaux sanguins primitifs. Il s'agit de la vasculogénèse [68]. L'angiogenèse désigne l'extension du réseau vasculaire préexistant et peut impliquer 3 mécanismes différents identifiés [69,70] (**Figure 9**):

- Le bourgeonnement (« *sprouting* ») qui définit l'extension de nouveaux capillaires. L'activation des cellules endothéliales va entraîner une dégradation de leur membrane basale et de la matrice extracellulaire à proximité, permettant la migration orientée des cellules, la prolifération puis la différenciation en structure capillaire.
- L'intussusception correspond à la séparation de vaisseaux par l'inclusion de cellules péri-endothéliales. Ce mécanisme permet de diviser un vaisseau « mère » en plusieurs petits micro-vaisseaux.
- La septation (« *bridging* ») correspond au cloisonnement d'un vaisseau par l'inclusion de cellules endothéliales, créant ainsi des canaux séparés.

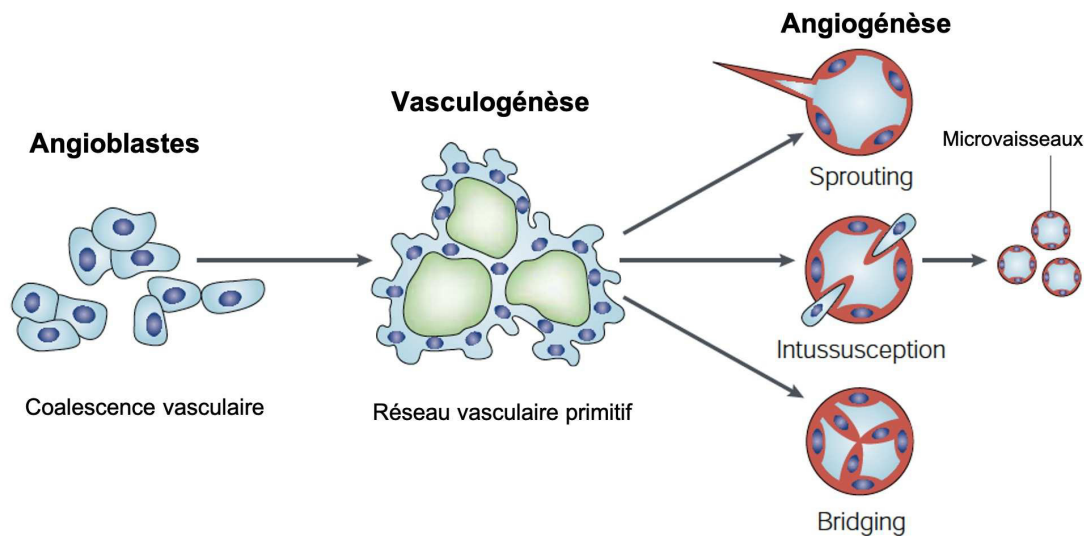


Figure 9 : Mécanismes généraux d'angiogénèses (d'après Hendrix et al. [69]).

L'angiogenèse n'est pas complète sans le recouvrement des tubes endothéliaux par des cellules péri-endothéliales comme les péricytes ou les cellules musculaires lisses. Ces cellules permettent de protéger le vaisseau d'une part, mais permettent aussi le contrôle hémostatique dans la lumière du vaisseau [71]. La matrice extracellulaire va ensuite stabiliser cette structure. Cette étape est connue sous le nom de maturation (**Figure 10**). Plus un vaisseau est soumis à des contraintes mécaniques, plus il va se recouvrir de cellules musculaires lisses qui permettront de mieux réguler le flux sanguin [72].

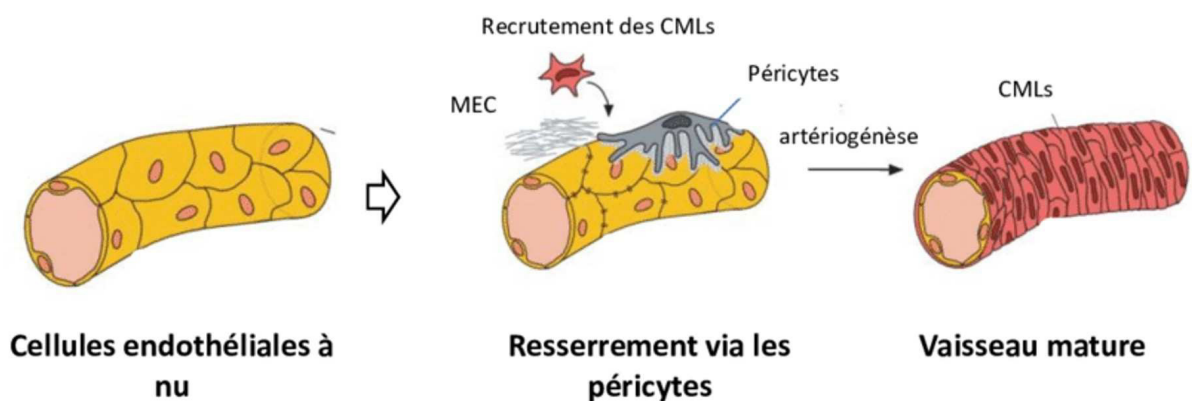


Figure 10 : Maturation vasculaire faisant suite à l'angiogenèse. CML : cellules musculaires lisses ; MEC : matrice extracellulaire (d'après Carmeliet [71]).

Chez un patient en bonne santé, le réseau vasculaire sanguin évolue très peu et le nombre de cellules en division ne dépasse pas 0.01% du nombre totale de cellules [73]. Cependant il peut y avoir des exceptions lors du processus de réparation tissulaire ou pendant le cycle menstruel chez la femme. A l'état basal (quiescent) les cellules endothéliales forment une monocouche cellulaire jointe par des molécules d'adhésions. Elles sont recouvertes par des péricytes et des cellules musculaires lisses. Même si elles sont quiescentes, elles peuvent répondre à des stimuli angiogéniques [74].

L'angiogenèse est donc un processus finement régulé et un dysfonctionnement d'un de ces mécanismes peut entraîner un état pathologique. Une angiogenèse insuffisante pourrait entraîner des ischémies tissulaires [75,76] qui peuvent être visibles dans les accidents vasculaires cérébraux ou certaines neuropathies, alors qu'une angiogenèse incontrôlée se retrouve dans la DMLA, ou dans les cancers [77,78].

2.1.2 Dans la DMLA

D'un point de vue purement fondamental, la DMLA néovasculaire apparaît comme une réponse aberrante à un mécanisme cicatriciel de réparation tissulaire, comme ce qu'il peut se passer au niveau de la peau. Cette définition a été corroborée ces dernières années par la mise en évidence d'un processus inflammatoire concomitant, apparaissant au niveau de la rétine [79]. La nature de cette réponse dépend de la rapidité d'apparition de ces dégâts tissulaires :

- Dans le cas d'une altération aiguë du tissu, les dommages collatéraux aux vaisseaux sanguins induisent une hypoxie aiguë, générant une réaction inflammatoire aiguë et l'activation d'une cascade cicatricielle accélérant le processus de réparation tissulaire.
- Dans le cas d'une maladie chronique telle que la DMLA, les altérations initiales sont souvent insidieuses et persistantes. Ces dégâts tissulaires vont créer un environnement inflammatoire et de cicatrisation chronique, qui par définition dans l'œil, ne permet pas la régénération des tissus comme sur la peau. La DMLA, avec son association maintenant reconnue à l'inflammation, répond bien à la définition d'une cicatrisation chronique, par la combinaison de facteurs environnementaux et d'une susceptibilité génétique individuelle [79].

Le développement de néovaisseaux est la base de la DMLA néovasculaire. Ces vaisseaux proviennent généralement de la choroïde puis s'étendent ensuite à la rétine via un déficit dans la membrane de Bruch [80]. Ils peuvent aussi pénétrer dans l'espace sous rétinien par une brèche de la barrière formée par l'EPR. Les néovaisseaux choroïdiens se développent comme des capillaires avec en général plusieurs points d'origine et peuvent provoquer des décollements séreux de l'EPR ou de la rétine, des brèches dans l'EPR et de l'exsudation lipidique [81]. Le développement de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux préexistants fait partie intégrante de certains processus : développement embryonnaire, réparation tissulaire, Cependant il peut également s'avérer nocif en alimentant la croissance tumorale ou en détruisant l'architecture rétino-choroïdienne par une néovascularisation aberrante. Un assemblage d'acteurs moléculaires est impliqué dans ce processus de formation vasculaire et dans le cadre de la DMLA, leur identification dans l'angiogenèse choroïdienne découle largement des recherches effectuées en oncologie.

Le développement de néovaisseaux au niveau choroïdien est provoqué par la libération locale de facteurs angiogéniques qui vont activer les cellules endothéliales [23]. C'est l'activation des récepteurs membranaires de ces cellules qui va déclencher des signaux intracellulaires moléculaires permettant la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire afin de former des nouveaux capillaires [74]. La provenance exacte de ces signaux n'est pas connue et leur cause n'est pas formellement identifiée. Il s'agit probablement d'une interaction entre des facteurs génétiques et environnementaux [79]. Plusieurs hypothèses pathogéniques ont été identifiées et peuvent participer au processus dégénératif amenant à la DMLA. Ces facteurs sont probablement intriqués entre eux et il est difficile de savoir quel mécanisme est primitif ou prépondérant.

- Le stress oxydatif agissant sur la rétine externe et notamment l'EPR est probablement un facteur précoce dans le processus dégénératif amenant à la néovascularisation [41,82].
- Le recrutement de cellules inflammatoires et les réactions qui en découlent [79].
- Les anomalies de la perfusion choroïdienne et choriocapillaire par les vaisseaux choroïdiens normaux augmentent avec l'âge [83–85].

Quel que soit le mécanisme primitif impliqué dans la genèse d'une DMLA, les médiateurs de l'angiogenèse impliqués ont été bien identifiés.

2.2 Les médiateurs de l'angiogenèse

2.2.1 Le VEGF

Le VEGF est une glycoprotéine signalétique produite par les cellules pour stimuler la vasculogénèse et l'angiogenèse. Un nombre important de médiateurs est impliqué dans le contrôle de l'expression du gène du VEGF. Ces voies impliquent généralement la protéine kinase C, la protéine kinase A ou la régulation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) [86–88]. D'autres mécanismes peuvent aussi réguler cette expression comme certaines cytokines [89,90], prostaglandines [91], ou encore certaines hormones [92–94]. Au niveau oculaire et rétinien en particulier, plusieurs mécanismes peuvent être identifiés expliquant la surexpression du VEGF dans l'œil.

Le VEGF fait partie du système restaurant l'apport en oxygène des tissus ischémiques. Il joue un rôle pivot dans l'angiogenèse lié à ses caractéristiques : ainsi, il possède un haut degré d'affinité pour les cellules endothéliales et il est très sensible à la situation hypoxique du tissu. Lorsqu'une cellule est déficiente en oxygène, elle produit un facteur transcriptionnel, l'*hypoxia inducible factor* (HIF). C'est en situation d'hypoxie qu'HIF persiste et stimule la transcription de VEGF (**Figure 11**) [95].

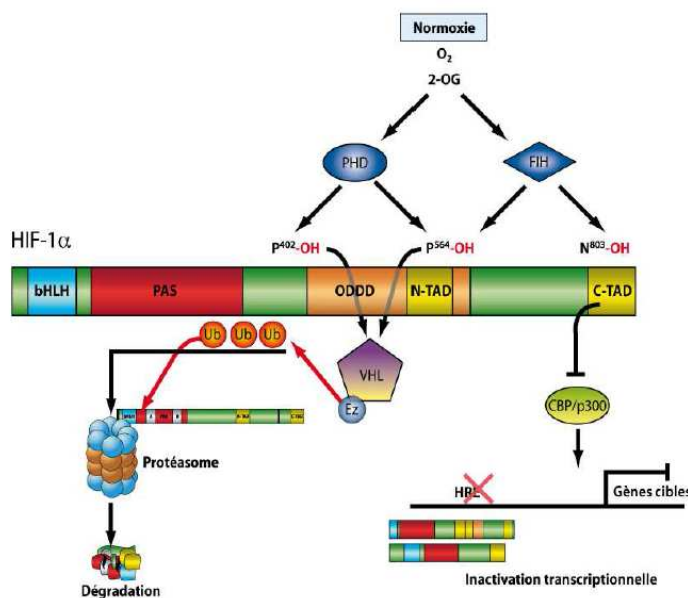


Figure 11 : Rôle du facteur de transcription HIF en fonction de la présence d'oxygène.

Figure 11a : L'Hydroxylation est la clé de la régulation de HIF. Dans des conditions normoxiques (pO_2 haute), les prolyl hydroxylases (PHD) et le facteur inhibiteur FIH sont actifs. Ces deux types d'enzymes hydroxylent respectivement deux résidus prolines dans le domaine ODDD (oxygen dependant degradation domain) et un résidu asparagine dans le domaine d'activation C-TAD de HIF α . L'hydroxylation des prolines P402 et P564 entraîne la

reconnaissance de HIF α par un complexe formé par la protéine VHL et une E3 ubiquitine ligase. L'ubiquitination de HIF α déclenche sa dégradation par le système du protéasome. L'hydroxylation de l'asparagine N803 inactive la fonction activatrice de HIF α en empêchant son interaction avec le complexe coactivateur CBP/P300.

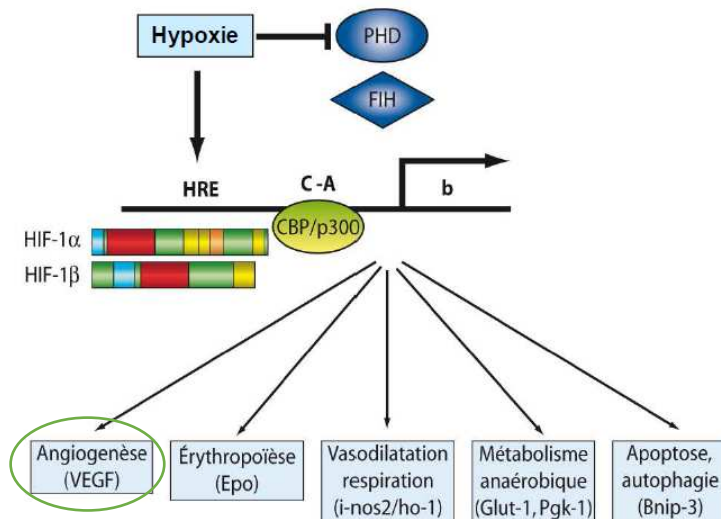


Figure 11b : Induction des gènes cibles de HIF α . Dans des conditions d'hypoxie (pO₂ basse), les propyl hydroxylases (PHD) et le facteur inhibiteur (FIH) sont inactifs. La sous-unité HIF α stabilisée forme un dimère avec la sous-unité HIF β et se fixe sur l'ADN au niveau d'un site HRE (*hypoxia responsive element*). Le complexe coactivateur (C-A) CBP/P300 se fixe au niveau du domaine d'activation C-terminal de HIF α et active l'expression d'un grand nombre de gènes cibles impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires.

D'autres mécanismes peuvent entraîner une augmentation du VEGF. Au cours du processus de vieillissement de l'EPR, des produits finaux de la glycation (AGE - *Advanced Glycation End products*), comme la pentosidine et la carboxyméthyllysine, et de la dégradation des lipides (ALE - *Advanced Lipoxidation End products*), sont formés et ont été retrouvés dans les dépôts laminaires basaux (BlamD - *Basal laminar Deposits*) et dans les drusen séreux [96]. Les AGE favorisent la liaison des fibres de collagène de la membrane de Bruch [97], ce qui réduit la taille des pores, diminuant ainsi la perméabilité de la matrice extracellulaire. En effet, les AGE réduisant la protéolyse enzymatique, perturbent la régulation du système de synthèse et de dégradation de la matrice [98]. La circulation des fluides à travers la membrane de Bruch est perturbée, diminuant ainsi les apports à l'EPR via la choriocapillaire favorisant ainsi l'hypoxie [99]. De plus, les AGE, via l'activation des récepteurs AGE de l'EPR (RAGE) [100], peuvent favoriser la survenue des épisodes néovasculaires via une sécrétion induite de VEGF [101].

Le stress oxydatif peut aussi induire une néovascularisation. En effet, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) induit une réduction dose-dépendante de l'expression du *pigment epithelium-derived*

factor (PEDF) [102] qui est un facteur anti-angiogénique. Les espèces intermédiaires réactifs à l'oxygène (*reactive oxygen intermediates*, ROI) participent à l'augmentation de l'expression du VEGF dans l'EPR [103].

La famille du VEGF comprend plusieurs membres chez les mammifères : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le *placental growth factor* (PlGF). De plus, le VEGF-E a été découvert chez les *parapoxviridae* et le VEGF-F dans le venin de serpent. Ces différents membres partagent une structure commune, mais ont des propriétés biologiques et physiques différentes. Ils agissent par le biais d'une famille de récepteurs tyrosine kinase : VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3.

2.2.1.1 Les récepteurs au VEGF

Il existe 3 types de récepteurs différents au VEGF (**Figure 12**) [104,105] :

Le VEGFR-1 a une haute affinité pour le VEGF-A, B, F et le PlGF. Il existe une forme soluble de ce récepteur permettant de piéger son ligand évitant la stimulation d'un autre récepteur par celui-ci. La réponse cellulaire suite à la stimulation de ce récepteur transmembranaire est très faible par rapport à celle au VEGFR-2.

Le VEGFR-2 peut fixer le VEGF-A, C, D, E, et F. La voie de signalisation associée à l'activation de ce récepteur transmembranaire induit la stimulation des cellules endothéliales leur permettant de proliférer et de migrer [106].

Le VEGFR-3 fixe le VEGF-C et le VEGF-D. Pendant le développement, ce récepteur est présent dans toutes les variétés de cellules endothéliales alors qu'à l'âge adulte, il n'est présent qu'au niveau des lymphatiques et des capillaires fenêtrés. Ce récepteur est essentiel pour la lymphangiogenèse. Une mutation de ce récepteur induit un lymphœdème congénital chez le nouveau-né.

De plus Neuropilin-1(NRP1) et Neuropilin-2 (NRP2) sont des co-récepteurs qui potentialisent les actions des récepteurs au VEGF et certains VEGF peuvent aussi se lier de manière indépendante aux NRPs [107]

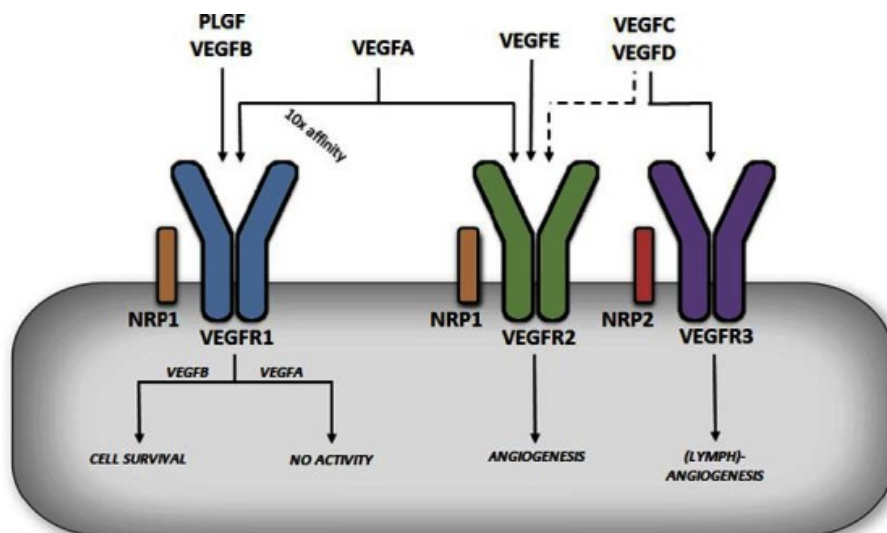


Figure 12 : Types de VEGF et leurs récepteurs VEGFR respectifs (d'après Lal et al. [108])

2.2.1.2 Les ligands

VEGF-A

Le VEGF-A joue un rôle central dans le développement d'une angiogenèse pathologique [5]. Il favorise la néovascularisation en ayant un effet mitogène sur les cellules endothéliales, en favorisant leur recrutement et en ayant une action anti-apoptotique sur ces cellules [109,110]. Il conduit de cette manière à la prolifération de cellules endothéliales, prolonge leur survie et facilite leur migration. Il augmente également la perméabilité vasculaire par induction d'une vasodilatation et d'une fenestration des capillaires [111]. La production de VEGF est stimulée par l'hypoxie et par l'action d'autres facteurs de croissance.

Le VEGF-A agit sur les récepteurs VEGFR1 et VEGFR2. Il possède de nombreuses isoformes se différenciant par leur nombre d'acides aminés, les 4 isoformes les plus importantes sont : VEGF-A 121, 165, 189 et 206 [112]. Ces isoformes diffèrent par rapport à leur liaison à la matrice extracellulaire et donc à leur diffusibilité. Ainsi, les formes les plus petites diffusent mieux. Par ailleurs leur sensibilité au récepteur n'est pas modifiée. Le VEGF-A₁₂₁ est une isoforme circulante, à la différence des isoformes 189 et 206 qui sont séquestrées presque en totalité au niveau de la matrice extracellulaire. Le VEGF-A₁₆₅ a des propriétés intermédiaires. Cette dernière isoforme est la plus abondante avec une distribution ubiquitaire. Elle semble être l'isoforme dont l'action est prédominante en angiogenèse, même si certaines études suggèrent que le VEGF-A₁₂₁ a un effet angiogénique supérieur [113]. Cet effet anti-angiogénique passe par l'activation du récepteur VEGFR-2. Néanmoins, le VEGF-A se lie avec 10 fois plus

d'affinité au récepteur VEGFR-1, qui possède une action très limitée (récepteur leurre) [114]. Le VEGFR-1 servirait donc à réguler négativement l'action du VEGFR-2 [115] et les souris *knout-out* (KO) pour le gène VEGFR-1 ne sont pas viables lors de l'embryogénèse à cause d'une hypervascularisation [116].

Le VEGF-A est produit de manière constitutive par les cellules d'EPR [117,118] et peut être impliqué dans un signalement paracrine entre l'EPR et la choriocapillaire. Il a été montré que le VEGF-A peut induire des fenestrations endothéliales [119], étant ainsi en accord avec un rôle de maintenance trophique sur la choriocapillaire par l'EPR [110]. Cette sécrétion du VEGF-A par l'EPR est polarisée. En condition normoxique, la sécrétion basale du VEGF-A (vers la membrane de Bruch) est 2 à 7 fois plus importante que la sécrétion apicale (vers les photorécepteurs) [120]. Cette différence est exagérée dans des conditions hypoxiques. De manière intéressante, plusieurs facteurs impliqués dans la DMLA, telles que les AGE, ROI et l'hypoxie sont tous des stimulateurs potentiels de l'expression du gène VEGF dans la cellule d'EPR [101,117].

De nombreuses évidences sont présentes dans la littérature pour montrer le rôle du VEGF-A dans la néovascularisation choroïdienne. Il a en effet été retrouvé surexprimé dans l'EPR des yeux autopsiés pour DMLA [121,122]. Par ailleurs, des injections intravitréennes de VEGF-A induiraient une prolifération des cellules endothéliales choroïdiennes sur des primates [123]. Le VEGF-A s'avère ainsi être nécessaire [124] et suffisant [123] pour le développement d'une néovascularisation rétinienne et irienne dans des modèles expérimentaux [125,126].

Le VEGF-B

Le gène du VEGF-B code aussi pour plusieurs isoformes, notamment les VEGF-B₁₆₇ et le VEGF-B₁₈₆ qui sont présents dans de nombreux tissus. Le VEGF-B peut se fixer sur le VEGFR-1 mais son rôle *in vivo* est encore mal connu. Néanmoins et contrairement au VEGF-A, l'hypoxie n'est pas inductrice de son expression. La souris KO homozygote pour le gène du VEGF-B a un cœur plus petit et présente une revascularisation myocardique moins efficace après un infarctus, suggérant un rôle du VEGF-B dans l'angiogenèse coronarienne [108]. Son rôle supposé dans l'angiogenèse pourrait être indirect en saturant les récepteurs « leurre »

VEGFR-1, permettant ainsi au VEGF-A de se fixer en plus grande quantité sur le récepteur VEGFR-2 stimulant ainsi l'angiogenèse (**Figure 13**) [108,127].

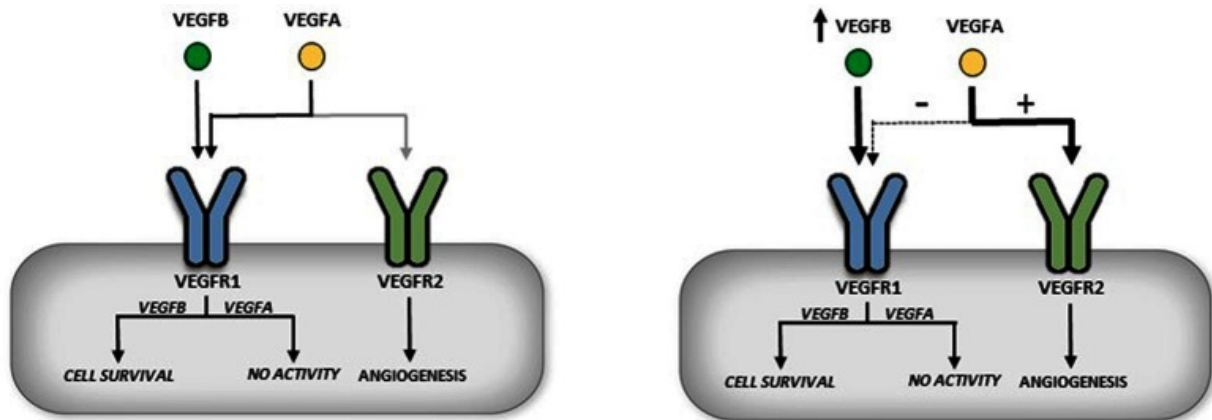


Figure 13 : Rôle du VEGF-B permettant d'accroître la stimulation du VEGFR-2 par le VEGF-A (d'après Lal et al. [108]).

Le VEGF-C

Le gène du VEGF-C code pour un précurseur protéique qui, sous l'action d'enzymes du milieu extracellulaire, va subir une maturation protéolytique. Le VEGF-C activé peut se fixer sur le VEGFR-2 et le VEGFR-3. Il est lui aussi exprimé dans de nombreux tissus où il stimule en partie la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales. Par ailleurs son rôle spécifique semble être la stimulation de la lymphangiogenèse qui serait médiée par les voies de signalisation sous-jacentes au VEGFR-3 [128].

Le VEGF-D

Il s'agit d'une glycoprotéine présentant presque 50% d'homologie avec le VEGF-C et qui subit le même processus de maturation dans la matrice extracellulaire. Il se fixe également sur les récepteurs VEGFR-2 et VEGFR-3 mais contrairement au VEGF-C, son absence n'affecte que peu la vie intra-utérine [129]. Il aurait un rôle dans le développement tumoral, favorisant notamment la diffusion métastatique.

Le VEGF-E et VEGF-F

Le VEGF-E a été retrouvé dans le génome du virus de l'Orf, de la famille des parapox virus. Il pourrait être responsable de la vasodilatation capillaire cutanée caractéristique de ces infections [130]. Il possède une affinité importante pour le VEGFR-2 stimulant ainsi la prolifération des cellules endothéliales et la perméabilité vasculaire.

Le VEGF-F a été découvert récemment dans le venin de serpents, et partagerait 50% d'homologie avec le VEGF-A₁₆₅. Sa fixation peut se faire avec le VEGFR-1 et le VEGFR-2. Le rôle de cette glycoprotéine n'est pas encore bien connu [131].

2.2.1.3 Thérapeutiques ciblant le VEGF oculaire

Une expression de VEGF a été démontrée dans des modèles expérimentaux d'ischémie rétinienne, de néovaisseaux sous-rétiens, ainsi que sur des prélèvements de néovaisseaux excisés chirurgicalement. Il est également présent dans l'humeur aqueuse et dans le vitré de patients ayant une néovascularisation associée à un diabète ou à une occlusion veineuse [132,133]. L'injection intravitréenne d'anticorps anti-VEGF a prouvé son efficacité à inhiber la néovascularisation dans des modèles expérimentaux d'ischémie rétinienne et de néovaisseaux iriens ou choroïdiens chez l'animal. La démonstration de cet effet d'inhibition a conduit au développement de nombreuses molécules ciblant le VEGF incluant des anticorps et fragments d'anticorps, des aptamères et des faux récepteurs (VEGF-Trap).

Les aptamères

Le pegaptanib sodium (MACUGEN®) est un oligonucléotide dont l'efficacité a été démontrée dans le traitement des formes exsudatives de DMLA dans le cadre d'une étude randomisée et contrôlée (VISION) [134,135]. Le pegaptanib est un aptamère dont la structure correspond à une courte séquence d'ARN faite de 28 bases. Cette molécule se lie au VEGF-A₁₆₅ avec une affinité élevée et une haute spécificité, prévenant ainsi l'activation des récepteurs du VEGF, et inhibant l'angiogenèse [136]. Le pegaptanib sodium se distingue ainsi des autres anti-VEGF par le fait qu'il se lie de façon spécifique à une seule isoforme du VEGF-A, empêchant ainsi la fixation du VEGF-A₁₆₅ sur son récepteur. Les résultats de l'étude VISION ont montré l'efficacité à deux ans des injections de pegaptanib sodium, réalisées toutes les 6 semaines, dans la prise en charge des néovaisseaux rétrofovéolaires associés à la DMLA. Celui-ci réduit le risque de baisse d'acuité visuelle modérée à sévère et réduit le risque de progression vers la

cécité légale. De plus, il permet à une plus faible proportion de patients une stabilité, voire un gain d'acuité visuelle comparativement au groupe de patients n'ayant pas eu d'injection [134,135].

Les anticorps anti-VEGF

Un anticorps est une glycoprotéine dont l'action est de neutraliser une cible spécifique appelée antigène. Sa structure est organisée en 2 chaînes lourdes (H pour heavy) et 2 chaînes légères (L pour light) qui sont reliées entre elles par un pont disulfure. Ces chaînes forment une structure en Y. Chaque chaîne est constituée d'un domaine variable et d'un (chaînes légères) ou plusieurs (chaînes lourdes) domaines constants. Ce sont les domaines variables qui permettent la spécificité d'un anticorps pour un antigène donné.

Plusieurs fragments peuvent être définis dans un anticorps (**Figure 14**) :

- Le fragment Fc (Fragment cristallisable) : il est constitué des fragments constants des chaînes lourdes au-delà de la région charnière. Il ne reconnaît pas l'antigène mais il est le support des propriétés biologiques de l'immunoglobuline.
- Le fragment Fab (Fragment antigen binding) : il est constitué de la chaîne légère en entier et d'une partie de la chaîne lourde (dont la partie variable) au-dessus de la région charnière. Il s'agit de la partie reconnaissant de manière spécifique l'antigène et à la même affinité pour celui-ci que l'anticorps complet.
- Le fragment Fv (Fragment variable) : il n'est constitué que par les domaines variables des chaînes légères et lourdes). Il fixe donc l'antigène avec la même affinité que l'anticorps complet.

Trois molécules anti-VEGF sont actuellement disponibles dans le traitement de la DMLA exsudative : Le bevacizumab (AVASTIN®), le ranibizumab (LUCENTIS®) et l'aflibercept (EYLEA®) (**Figure 14**).

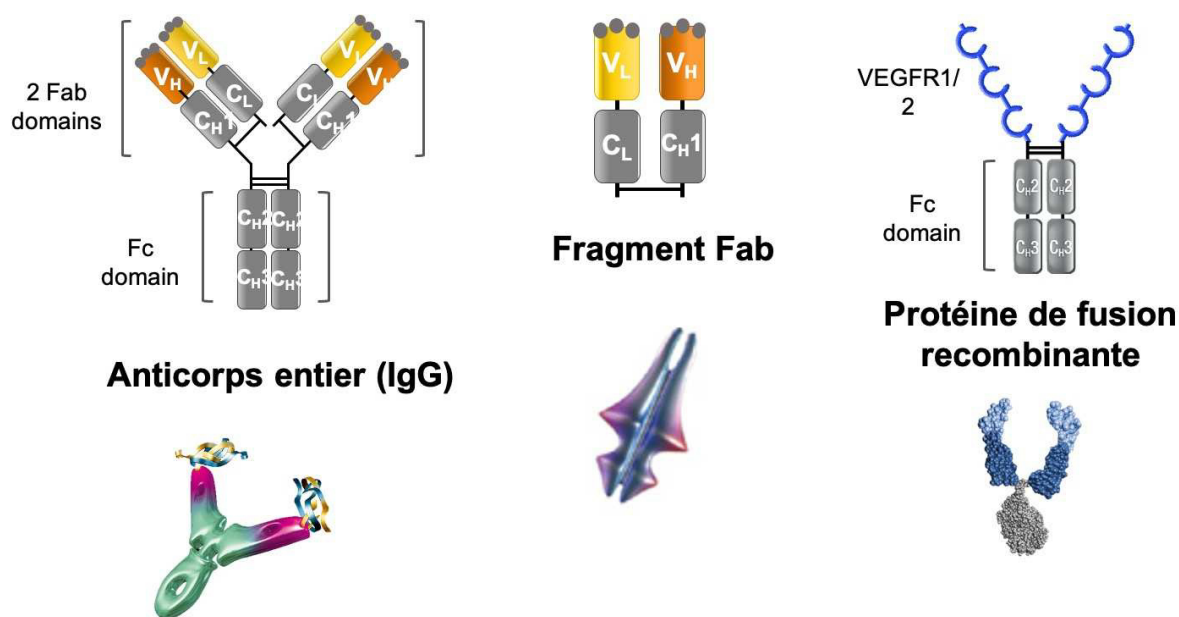


Figure 14 : Différents types d'anticorps ciblant le VEGF-A.

Le bevacizumab

Cette molécule a été produite par humanisation d'un anticorps de souris dirigé contre le VEGF-A : Mab A.4.6.1. Des manipulations de l'anticorps de souris ont conduit au développement d'une fraction humanisée Fab de l'anticorps murin (Fab-12), dont est directement issu le bevacizumab. Cette molécule a deux domaines de liaison antigénique sur chacun de ses bras Fab. L'action du bevacizumab est dirigée contre toutes les formes actives du VEGF-A. De nombreuses études prospectives et rétrospectives ainsi que des études nationales multicentriques ont évalué l'efficacité du bevacizumab dans le traitement de la DMLA exsudative, ainsi que sa non-infériorité par rapport au ranibizumab [137]. A ce jour, le bevacizumab bénéficie d'une autorisation temporaire d'usage (ATU) pour son utilisation dans la DMLA exsudative en France.

Le ranibizumab

Le ranibizumab est dérivé d'un variant humanisé de la fraction Fab de l'anticorps murin contre le VEGF-A : Mab A.4.6.1. Cette fraction a ensuite subi un processus de maturation afin d'augmenter son affinité pour le VEGF-A (Variant Y0317). Le ranibizumab a une affinité pour le VEGF-A 100 fois supérieure à celle de la fraction Fab-12 dont est issu le bevacizumab [138]. De plus, le ranibizumab étant dépourvu de fragment Fc, il ne peut pas se lier au récepteur C1q

du complément ou aux récepteurs Fcγ, et ainsi, ne participe pas à l'activation des réponses immunologiques médiées par le système du complément. Deux études de phase III ont validé l'utilisation du ranibizumab dans le traitement de la DMLA exsudative. L'étude MARINA a montré que l'administration de ranibizumab permet non seulement de préserver la vision, mais autorise également un gain d'acuité visuelle des patients traités durablement sur les 2 ans de suivis par rapport au groupe témoin non traité [139]. L'étude ANCHOR a montré que le ranibizumab permet de préserver l'acuité visuelle des patients présentant des néovaisseaux à prédominance visible au cours de la DMLA et d'améliorer le niveau moyen d'acuité visuelle [10]. Le résultat fonctionnel des injections intravitréennes mensuelles de ranibizumab est supérieur dans cette indication aux résultats obtenus avec la photothérapie dynamique.

Les anti-VEGF-Trap

Le VEGF-Trap commercialisé sous le nom d'Aflibercept (EYLEA®) est une protéine soluble qui se comporte comme un récepteur du VEGF. C'est une protéine de fusion recombinante composée des domaines extracellulaires des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 humains fusionnés au fragment Fc de l'immunoglobuline G1 humaine (IgG1) (**Figure 15**). L'Aflibercept agit comme un leurre soluble de récepteur, qui se lie au VEGF-A et au PlGF avec une affinité supérieure à celle de leurs récepteurs naturels et peut ainsi inhiber la liaison et l'activation de ces récepteurs apparentés [140]. Les études randomisées contrôlées de phase III, VIEW1 et VIEW2, ont montré que l'Aflibercept injecté tous les 2 mois après une dose de charge chez des patients atteints de DMLA exsudative, a un effet équivalent à une injection mensuelle de ranibizumab [141].

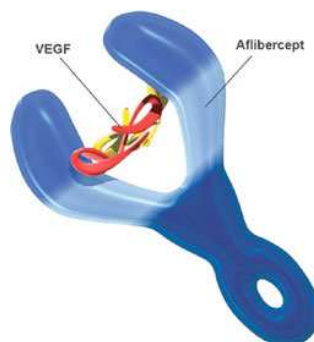


Figure 15 : VEGF-Trap. La molécule de VEGF est piégée dans un récepteur leurre qui va inhiber son action sur le VEGFR1 et le VEGFR2.

2.2.2 Le PlGF

2.2.2.1 Mécanismes généraux

Le PlGF (placenta growth factor) a été découvert, comme son nom l'indique, dans le placenta humain [142]. Malgré cela, il est également exprimé dans d'autres tissus tels que le cœur et le poumon. L'épissage alternatif du gène permet la formation de 4 isoformes différentes, les PlGF-1, PlGF-2, PlGF-3 et PlGF-4 [142–144]. Proche de la structure du VEGF-A, le PlGF peut se fixer sur le récepteur VEGFR-1 [145]. Cependant, il ne se fixe sur le VEGFR-2 qu'à l'état d'hétérodimère PlGF-VEGF. De plus le PlGF-2 est aussi capable de se fixer sur d'autres types de récepteurs tels que les corécepteurs au VEGFR que sont les NRP-1 et 2 permettant notamment son intervention dans l'embryogénèse du système cardiovasculaire [146,147].

Le PlGF affecte la réponse de différents types cellulaires et régule plusieurs systèmes de réponses biologiques. L'une des premières activités identifiées est son effet sur la croissance vasculaire et sa maturation [148–150]. Cette activité pro-angiogénique s'appuie sur la mise en évidence d'un effet direct sur les cellules endothéliales et les cellules constituant le mur vasculaire, mais aussi par son action indirecte sur des cellules non-vasculaires possédant une activité pro-angiogénique (macrophages par exemple). Le PlGF augmente la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales, même si certains de ces effets semblent débattus [148,150,151]. Ce facteur de croissance stimule aussi la prolifération des fibroblastes mésenchymateux et régule la réponse contractile des cellules vasculaires murales, organisées autour de l'endothélium pendant la croissance et la collatéralisation vasculaire [149,152]. De plus, le PlGF peut recruter des progéniteurs myéloïdes pour permettre le bourgeonnement vasculaire et la collatéralisation [153,154]. Le PlGF peut aussi activer et recruter des macrophages, capables à leur tour de relarguer des médiateurs pro-angiogéniques et des facteurs lymphangiogéniques [155].

Concernant les mécanismes angiogéniques du PlGF, ceux-ci sont débattus et dépendraient de la concentration du PlGF dans le milieu et du type de récepteur stimulé. En se liant aux récepteurs VEGFR-1, le PlGF rentre en compétition avec le VEGF pour se lier à ce récepteur qui n'a normalement pas d'activité angiogénique directe (Récepteur leurre). Cela aura pour effet d'augmenter le stock de VEGF capable de se fixer au récepteur pro-angiogénique VEGFR-2 [156]. De plus l'activation du PlGF sur le VEGFR-1 semblerait entraîner une amplification du signal VEGF/VEGFR-2 par induction d'un message intermoléculaire entre les 2 récepteurs [157]. La phosphorylation différentielle des tyrosines intracellulaires du récepteur VEGFR-1

par le PlGF et le VEGF explique la différence d'action de ces molécules sur ce même récepteur [157]. Cependant, d'autres études retrouvent des résultats différents sur l'angiogenèse. En effet, l'activation du VEGFR-2 par l'hétérodimère PlGF-VEGF diminuerait l'action directe plus importante de l'homodimère VEGF-VEGF dans des modèles d'angiogenèse tumorale avec hyperexpression du PlGF [158,159]. Ces modèles montrent en effet une diminution de l'angiogenèse avec l'augmentation importante des taux de PlGF, expliquant la complexité des interactions entre ligand et récepteur [160]. Il apparaît difficile de déterminer si cet hétérodimère formé entre PlGF-VEGF est anti- ou pro-angiogénique. Il faut néanmoins se méfier de modèles *in vivo* chez l'animal, ces derniers entraînent une surexpression du PlGF et augmentent largement son taux dans le milieu. Ainsi, en physiologie humaine, l'action du PlGF semble être pro-angiogénique [161].

2.2.2.2 Rôle dans la néovascularisation oculaire

Le PlGF a été retrouvé élevé dans le vitré et la rétine de patients diabétiques [162,163], et chez les patients et les modèles animaux de DMLA néovasculaire [164,165]. La déficience du gène codant pour le PlGF entraîne une inhibition du développement néovasculaire choroïdien chez les souris [164]. Le blocage pharmacologique du PlGF semble aussi diminuer ce développement chez la souris [166]. La combinaison d'un anti-PlGF et d'un anti-VEGFR-2 semble même plus efficace que la monothérapie seule par anti-PlGF pour inhiber l'angiogenèse. En plus de cet effet sur l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire, les anti-PlGF augmentent la maturation vasculaire et diminuent la réaction inflammatoire, contrairement aux anticorps anti-VEGFR-2 [166].

2.2.3 FGF2

Le VEGF n'est pas le seul facteur de croissance impliqué dans la formation des néovaisseaux choroïdiens (NVC). Même si le fibroblast growth factor 2 (FGF2) est présent dans différents processus développementaux, y compris l'angiogenèse [167], son rôle dans la néovascularisation oculaire est moins connu. Pourtant une surexpression du FGF2 a été retrouvée dans les membranes néovasculaires de patients atteints de DMLA ainsi que dans les membranes épirétiniennes des patients avec une rétinopathie diabétique [121]. De la même manière le gène se retrouve aussi surexprimé dans des modèles murins de NVC [168].

L'administration exogène de FGF2 déclenche une néovascularisation choroïdienne mais celle-ci ne pénètre pas la membrane de Bruch [169,170]. Par ailleurs, l'inactivation du gène FGF2 ne permet pas d'inhiber le développement de NVC dans des modèles de laser chez la souris [171]. Ces données suggèrent que le FGF2 n'est ni suffisant ni nécessaire pour provoquer un véritable NVC.

2.2.4 Platelet-derived growth factor (PDGF)

La famille des PDGF contient 4 isoformes : le PDGF A, B, C et D qui sont structurellement proches du VEGF [113,172]. Les PDGFs sont des ligands de 2 récepteurs à tyrosine kinase, le PDGFR- α et β . C'est principalement le récepteur PDGFR- β qui est responsable de la transduction du signal dans les cellules du réseau vasculaire : endothélium, péricytes et cellules musculaires lisses. En plus de son rôle central dans le développement du système vasculaire, le PDGF intervient dans d'autres processus tels que la cicatrisation et le développement du système nerveux central [173].

Plusieurs études ont confirmé le rôle du PDGF-B dans le développement du réseau vasculaire, en stimulant la prolifération et la formation de tube capillaire de cellules endothéliales [174]. Le PDGF-B est notamment impliqué dans le recrutement des cellules « murales », péricytes et cellules musculaires lisses [175]. Les péricytes dérivent du même progéniteur cellulaire que les cellules musculaires lisses vasculaires. Elles sont contractiles et recouvrent les cellules endothéliales avec qui elles partagent la même membrane basale [71]. Cette relation anatomique permet aux péricytes de subvenir localement aux besoins en VEGF des cellules endothéliales, ainsi qu'aux autres facteurs de croissance par des mécanismes paracrines et juxtacrines. Il a ainsi été proposé que les péricytes pouvaient protéger les cellules endothéliales de certaines thérapies anti-VEGF et joueraient ainsi un rôle dans la résistance aux anti-VEGF.

La suppression du gène du PDGF-B est létale en période périnatale par hémorragies et anomalies du système vasculaire [176]. L'ablation du récepteur PDGFR- β aboutit au même phénotype [177]. La prolifération des cellules constituant le mur vasculaire est aussi réduite chez ces souris avec délétion des gènes PDGFR- β ou PDGF-B [175]. De la même manière, l'administration d'un aptamère spécifique du PDGF-B entraîne une perte des péricytes et une régression des vaisseaux tumoraux dans un modèle tumoral murin [178]. Ces données indiquent que le PDGF-B produit par les cellules endothéliales est essentiel pour la prolifération, la

migration et le recrutement des cellules de la paroi vasculaire, et pour le développement des capillaires [175].

L'étude de modèles de néovascularisation oculaire chez la souris a permis d'identifier le PDGF-B comme l'un des acteurs du recrutement des péricytes sur des néovascularisations cornéennes [179] ou rétinienne [180]. Concernant les rôles respectifs du VEGF et du PDGF-B, il s'avère que l'inhibition du VEGF seul permet de diminuer le développement néovasculaire induit par laser, tandis que le blocage du PDGF-B n'entraîne aucune modification. Cependant, le blocage concomitant de ces 2 voies entraînait une inhibition de l'angiogenèse plus importante. Sur un modèle de néovascularisation cornéenne, le blocage du PDGF-B entre le 10^e et le 20^e jour après l'induction de la néovascularisation entraînait un détachement des cellules constituant le mur vasculaire. Le blocage du VEGF réduisait, quant à lui uniquement la néovascularisation lorsqu'il était effectué dans les premiers jours après l'induction. En revanche il n'entraînait pas de réduction de cette angiogenèse lorsque les vaisseaux étaient plus matures. Cependant, lorsque les 2 traitements étaient donnés de manière concomitante, ils pouvaient agir sur ces vaisseaux matures. Ces expériences suggèrent qu'une stratégie combinant le blocage du VEGF et du PDGF-B pourrait être plus efficace sur les vaisseaux matures créés par l'angiogenèse, tout en prévenant une nouvelle néovascularisation [181]. Pourtant, alors que les phases I et II de l'essai thérapeutique associant anti-PDGF et anti-VEGF dans le traitement de la DMLA exsudative avaient montré une efficacité supérieure de la combinaison des 2 molécules [182,183], celle-ci n'a pas été confirmée par la phase III même s'il apparaît que le design de ces études aurait pu être optimisé [184].

2.2.5 Intégrines

Les intégrines sont des protéines transmembranaires dont l'extrémité extracellulaire interagit généralement avec des protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine et la vitronectine. Ces récepteurs régulent des voies de signalisation contrôlant la migration, la prolifération, l'adhésion et la différenciation cellulaire. Ils ont été étudiés dans des modèles de cancer, où ils affectent l'angiogenèse tumorale, le grossissement de la tumeur et les métastases [185]. Plusieurs types de combinaisons entre les différentes sous unités ont été identifiées.

Les intégrines sont formées par une sous-unité α et une sous-unité β . Plusieurs études ont montré que certaines combinaisons de sous-unités étaient liées à des pathologies néovasculaires dans l'œil. Spécifiquement, l'expression de $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ a été retrouvée élevée dans des yeux

avec DMLA exsudative ou rétinopathie diabétique [186], et leur inhibition permettait la régression de l'angiogenèse dans leur modèles respectifs [187–189].

L'interaction entre l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ et son ligand la fibronectine contribuerait à l'angiogenèse d'une voie différente de celle du VEGF [190], et son inhibition réduirait l'angiogenèse dans plusieurs types de modèles murins [191,192]. Il semblerait qu'une partie de ces effets soit liée à un blocage de la migration et de la formation des tubes de cellules endothéliales [193].

2.2.6 Autres molécules impliquées

Le récepteur Eph est un type de récepteur à tyrosine kinase qui a comme ligands les éphrines. Le couple Ephrine/eph est uniquement actif sur les interactions directes de cellule à cellule. Les ligands d'éphrine sont divisés en 2 sous-classes : les éphrines A et B qui diffèrent selon leur structure et leur liaison avec la membrane cellulaire [194]. De la même manière les récepteurs aux éphrines sont aussi classés en EphA et B en fonction de leur affinité de liaison avec les ligands [195,196]. De nombreux processus sont régulés par cette voie de signalisation dont l'angiogenèse [196]. En particulier, ils permettent la détermination du devenir artériel et veineux des cellules endothéliales [197]. Au niveau oculaire, leur rôle reste encore à être défini.

Notch est une protéine transmembranaire représentée par 4 membres de Notch1 à 4. Il est activé par des ligands transmembranaires lors d'un contact cellule à cellule. L'activation du récepteur par le ligand va entraîner un clivage de Notch, relargant le domaine intracellulaire qui va être transloqué dans le noyau de la cellule, induisant la transcription de certains gènes [198,199]. La signalisation induite par Notch joue un rôle essentiel dans l'organisation de la disposition des tissus et notamment du système cardiovasculaire [198]. C'est le ligand Dll4 qui semblerait jouer le principal rôle dans le contrôle du développement vasculaire via le système Notch [199]. Le couple Notch/Dll4 diminuerait le développement aberrant et incoordonné des ramifications vasculaires liées à l'augmentation de l'angiogenèse par le VEGF [200,201].

Les métalloprotéinases (MMP) regroupent un large spectre d'enzymes qui augmentent l'angiogenèse en dégradant la matrice extracellulaire et en facilitant l'invasion par des néovaisseaux [202]. Il a été montré que certains facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, le FGF2 et le TNF- α augmentent l'expression du MMP dans les cellules d'EPR [203].

L'érythropoïétine (EPO) est une glycoprotéine dont la concentration augmente avec l'hypoxie et dont la principale action est d'induire l'érythropoïèse [204]. D'autres actions ont aussi été décrites telles que la neuroprotection [205] et l'angiogenèse. En effet, l'EPO contribuerait à l'angiogenèse en réponse à l'ischémie via une surexpression des gènes du VEGF / VEGFR et en augmentant le recrutement de progéniteurs cellulaires endothéliaux [206]. Plusieurs études ont montré une augmentation de l'EPO dans les yeux développant une néovascularisation liée au diabète [207,208] et il semble exister une augmentation du risque de rétinopathie de la prématurité chez les nouveau-nés traités par EPO [209].

Certaines cytokines comme le $\text{TNF}\alpha$ ou des médiateurs de la cascade du complément se retrouvent surexprimées dans les cas de NVC mais leur rôle direct dans l'angiogenèse n'est pas certain et pourrait passer par la réaction inflammatoire inhérente ou préliminaire à ce mécanisme [49,58].

III- MODÈLES ANIMAUX ET CELLULAIRES DE DMLA NÉOVASCULAIRE

Le développement de modèles animaux reproduisant la néovascularisation choroïdienne a contribué à la compréhension des phénomènes biologiques de cette complication. Les modèles ont aussi été développés pour tester de nouveaux traitements.

L'histoire naturelle d'un néovaisseau choroïdien est un processus dynamique qui enchaîne phase d'initiation, phase de maintenance et involution du néovaisseau [210]. Le degré d'inflammation associé à cette néovascularisation dépend de la maladie sous-jacente et du stade d'évolution du néovaisseau [211]. Les modèles produisant les néovaisseaux doivent aussi reproduire ces phases évolutives de la maladie.

3.1 Néovaisseaux induits par laser

Le modèle d'induction de NVC par laser est le plus utilisé car il reproduit au plus proche les étapes de l'angiogenèse amenant à la néovascularisation. Le but de l'utilisation du laser pour créer une néovascularisation est de créer une brèche dans la membrane de Bruch par photocoagulation au travers de la pupille dilatée [212,213]. Lorsque le spot atteint la rétine et crée cette rupture de la membrane de Bruch, une petite bulle se crée et une hémorragie rétinienne peut survenir [213]. L'angiographie à la fluorescéine, réalisée ensuite *in vivo* sur les yeux des animaux ayant subi la procédure, montre le NVC et l'examen histologique sur les yeux énucléés le confirme (**Figure 16**). Différents types de laser ont été utilisés pour créer cette lésion et les résultats divergent selon les équipes et les puissances utilisées pour chaque type de laser (Argon, Xenon, Krypton,...) [214].

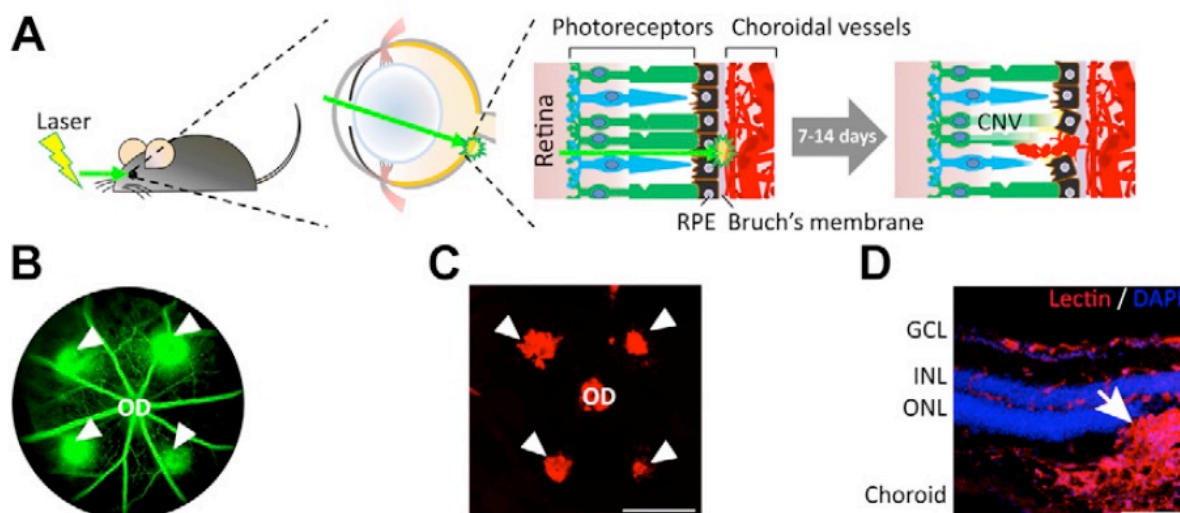


Figure 16 : Modèle de néovascularisation induite par traumatisme laser. A. Schéma d'un traumatisme laser sur un œil de souris provoquant une rupture de l'épithélium pigmentaire rétinien (retinal pigment epithelium, RPE) et de la membrane de Bruch qui est nécessaire au développement d'un néovaisseau (choroidal neovessel, CNV) ; B. Angiographie représentative de 4 impacts laser réalisés sur une rétine de souris 1 semaine auparavant. Noter la diffusion du colorant signant la présence d'une membrane néovasculaire. C. Image de microscopie en fluorescence après marquage à l'isolectine de la rétine de souris ayant subi 4 impacts laser à 1 semaine. D. Examen immunohistologique sur une coupe de rétine de souris ayant eu des impacts laser 1 semaine auparavant (d'après Liu et al. [215]).

Classiquement 3 phases évolutives sont visibles lors de l'induction d'un NVC par photocoagulation laser : la première phase est l'évolution du néovaisseau qui s'accompagne du recrutement de cellules immunitaires. Ce recrutement semble maximal vers 3-4 jours après la lésion. La deuxième phase correspond à l'évolution maximale du néovaisseau qui apparaît aux alentours du 7^{ème} jour. Il s'ensuit alors une troisième phase marquée par l'involution du néovaisseau qui devient plus mature et évolue vers la fibrose. Conjointement à cette dernière phase, il est noté une clairance des cellules immunitaires participant à la sécrétion de facteurs de croissance [214,216,217].

Bien que ce modèle soit reproductible, facile et qu'il puisse rapidement être mis en œuvre pour en faire un modèle de référence de DMLA néovasculaire [218], il possède plusieurs défauts. Tout d'abord, il s'agit plus d'un modèle de cicatrisation aiguë provoquée par un spot de photocoagulation laser qu'une dégénérescence à long terme de la membrane de Bruch et de l'EPR. Ce modèle est aussi limité par le petit diamètre de l'œil de la souris par rapport à celui du spot de photocoagulation laser, pouvant amener à des variations de la taille des NVC induits

dans le même œil. Enfin, il est toujours hasardeux d'extrapoler des résultats sur la dégénérescence maculaire d'un animal ne possédant pas de macula.

3.2 Néovaisseaux induits par traumatisme chirurgical

Des néovaisseaux sous-rétiniens et choroïdiens ont été créés de manière immunologique et mécaniquement par l'injection de peptides, de vecteurs viraux contenant du VEGF, ou par du matériel inerte injecté directement sous la rétine ou dans la choroïde. Cette technique peut aussi s'apparenter aux techniques utilisées dans le modèle expérimental d'uvéïte autoimmune (EAU) [219]. Il est difficile de savoir si le NVC fait suite à l'inflammation liée au produit injecté dans le compartiment oculaire visé, ou s'il fait suite à la brèche effectuée dans la membrane de Bruch par l'aiguille ayant permis l'injection [214]. D'ailleurs, il a été montré que l'injection suprachoroïdienne de basic FGF provoquerait une angiogenèse choroïdienne mais pas de NVC car il n'y a pas de rupture de la membrane de Bruch [169]. Effectivement, Killgaard et al. ont montré chez le porc qu'un NVC était visualisé après photocoagulation au laser Xenon, au laser diode, et après débridement chirurgical de l'EPR dans 54%, 83% et 100% des cas respectivement. Ces résultats confirment également que la rupture de la membrane de Bruch est nécessaire pour le développement d'un NVC [220]. Une autre étude a montré que c'est la perforation de la membrane de Bruch et non de l'EPR qui permet le développement d'un NVC [221,222].

3.3 Néovaisseaux induits par modèles transgéniques de souris

Bien qu'il existe de nombreux modèles de souris transgéniques qui permettent de reproduire certaines composantes de la DMLA [79], très peu de ces modèles développent des NVC. Le VEGF a un rôle central dans le développement des néovaisseaux, mais sa surexpression par les cellules de l'EPR n'est pas suffisante pour produire un néovaisseau. En effet, la membrane de Bruch n'est pas assez altérée dans ces modèles pour laisser la néovascularisation atteindre l'espace sous rétinien. Un modèle de souris où l'expression du VEGF₁₆₄ est augmenté via le promoteur du gène RPE65 montre un développement de néovaisseau intrachoroïdien sans développement de véritable NVC [223]. Ces constatations démontrent bien que le meilleur modèle pour le développement de NVC est celui où la membrane de Bruch est physiquement atteinte [224].

En revanche, d'autres modèles de souris, notamment ceux entraînant un état pro-inflammatoire, sont associés à une majoration de l'aire de la néovascularisation après une photocoagulation laser. C'est le cas par exemple pour les souris transgéniques CX3CR1^{-/-}, où l'inflammation sous rétinienne est plus marquée [50,79].

3.4 Culture de cellules endothéliales et explants choroïdiens

Le développement d'un modèle reproduisant le lit microvasculaire de la choroïde est nécessaire pour comprendre les modifications biologiques liées à l'angiogenèse des cellules endothéliales. L'utilisation de lignées cellulaires immortalisées telles que les cellules endothéliales humaines provenant des veines du cordon ombilical (*human umbilical vascular endothelial cells*, HUVEC) est limitée par le manque de spécificité de ce type cellulaire par rapport à la structure microvasculaire de la choroïde. Cependant l'utilisation de cellules choroïdiennes pour explorer ces interactions moléculaires spécifiques est rendue compliquée par la difficulté à isoler et purifier ces cellules sur les choroïdes de souris [225–227]. Enfin, l'utilisation de cellules choroïdiennes humaines immortalisées (*human choroidal endothelial cells*, HCEC) peut être un choix judicieux mais est limitée par les altérations génétiques inhérentes à la génération de ce type de modèle [228].

Les expérimentations sur anneaux aortiques, isolés depuis les aortes d'espèces murines, permettent d'étudier les mécanismes d'angiogenèse se produisant sur des larges vaisseaux, mais ne représentent pas les microvaisseaux comme ceux rencontrés dans la choroïde et la choriocapillaire. Pour surmonter ces limites, un modèle d'explant choroïdien a été développé, permettant d'imager les modifications vasculaires sous l'influence de différents traitements en culture [189,229]. Ce modèle ex-vivo a l'avantage d'être facilement réalisable et de faire intervenir l'ensemble de la diversité cellulaire présent dans la choroïde (**Figure 17**).

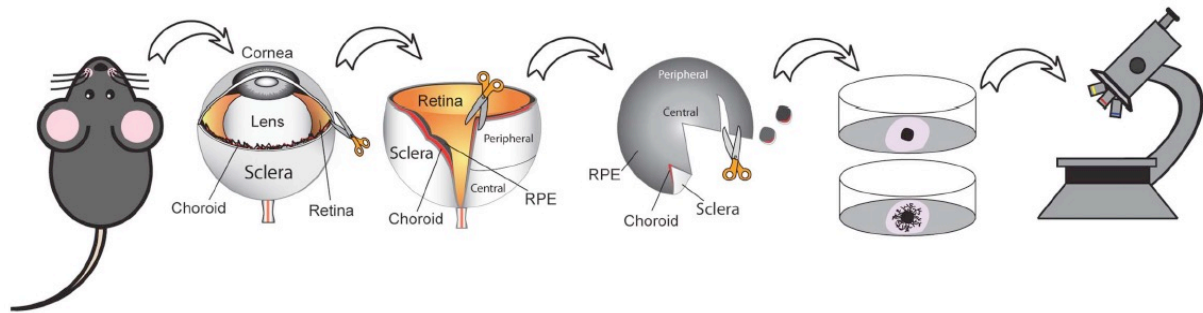


Figure 17 : Modèle d'explants choroïdiens de souris. Les yeux de souris sont énucléés puis disséqués afin de ne mettre en culture que la partie choroïdienne. La croissance vasculaire après un temps défini est ensuite mesurée grâce à la comparaison des images prises à chaque temps (d'après Shao et al. [229]).

3.5 Organoïdes de rétine

Un organoïde est une structure cellulaire tridimensionnelle qui a pour but de reproduire *in vitro* l'anatomie d'un organe [230]. Ce modèle peut être généré à partir de cultures primaires, mais plus souvent à partir de cellules souches embryonnaires, ou d'*induced pluripotent stem cells* (iPS). Ces cellules vont ensuite s'arranger dans une structure tridimensionnelle, répondant ainsi aux limites de la culture conventionnelle où les cellules s'organisent de manière aléatoire [231].

La modélisation d'un organoïde rétinien est compliquée car il s'agit d'une structure très fine et complexe comportant une grande variété de type cellulaire et de nombreuses connexions intercellulaires. Ainsi, seuls quelques aspects de sa fonction peuvent être expérimentés dans un modèle. De nombreuses équipes travaillent principalement sur le développement de 2 fonctions rétiniennes : la première étudiant la partie neurosensitive incluant les photorécepteurs, les cellules ganglionnaires et le nerf optique ; la seconde la dynamique de la choriocapillaire, l'EPR et ses interactions via la BHR [232].

PARTIE B. DOPAMINE & MALADIE DE PARKINSON

I- LA DOPAMINE

1.1 Introduction

La dopamine est l'une des nombreuses substances neuroactives dans le corps et le cerveau. Ce neurotransmetteur est impliqué dans de nombreuses fonctions basiques, telles que le comportement moteur, la cognition ou l'état émotionnel. Lorsque le système dopaminergique est dérégulé, la conséquence pour le corps et le cerveau peut être grave : maladie de Parkinson, chorée de Huntington, schizophrénie, ...

La dopamine est une monoamine, c'est-à-dire un dérivé d'acide aminé comportant un groupement éthylamine lié à un noyau aromatique de type catéchol (**Figure 18**). Elle dérive de la tyrosine et à ce titre, appartient à la famille des catécholamines qu'elle partage avec l'adrénaline et la noradrénaline qui peuvent être des produits de sa métabolisation.

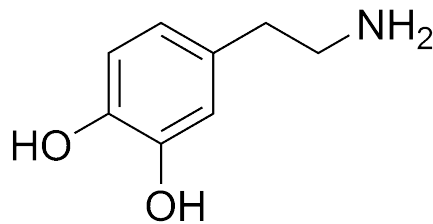


Figure 18 : Schématisation d'une molécule de dopamine.

1.2 Synthèse de la Dopamine

La dopamine est synthétisée à partir de la tyrosine, un acide aminé non essentiel issu de l'hydroxylation de la phénylalanine par la phénylalanine hydroxylase. La production de dopamine passe par une réaction utilisant 2 enzymes : la tyrosine hydroxylase (TH), une enzyme limitante contrôlant la production de L-DOPA, puis par la DOPA-décarboxylase (DDC) assurant la décarboxylation pour donner la dopamine (**Figure 19**).

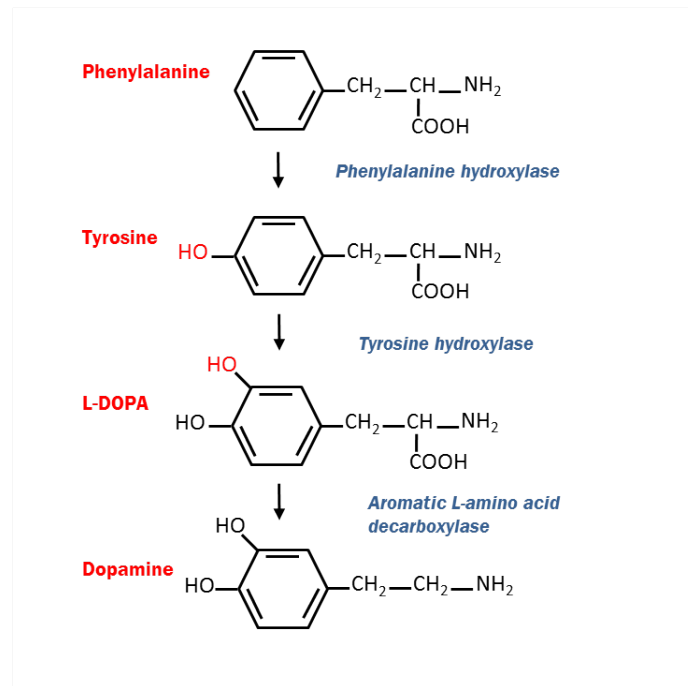


Figure 19 : Voie de synthèse de la dopamine.

Après avoir été synthétisée dans le cytoplasme des axones des neurones dopaminergiques, la dopamine est chargée dans des vésicules synaptiques par le *vesicular monoamine transporter 2* (VMAT2). Lorsque le neurone est traversé par un potentiel d'action, les vésicules libèrent leur contenu dans le milieu extracellulaire par exocytose.

La dopamine ainsi relarguée dans la synapse peut avoir 4 directions différentes (**Figure 20**) :

- Transmission du signal neuronal par transduction en se liant aux récepteurs dopaminergiques métabotropes se situant sur la cellule postsynaptique.
- Activation des récepteurs D2-like sur le neurone dopaminergique présynaptique. Celui-ci va entraîner une diminution de la libération de la dopamine par inhibition de l'exocytose présynaptique.
- Recapture par le neurone dopaminergique via le transporteur membranaire sélectif de la dopamine (*dopamine active transporter*, DAT).
- Dégradation extracellulaire par l'enzyme catécholamine-O-méthyltransférase (COMT) donnant l'acide homovanillique (HVA), ou dégradation intracellulaire à l'intérieur du neurone dopaminergique par des enzymes mitochondriales, les monoamine-oxydases A et B (MAO) donnant l'acide dihydroxyphénylacétique (DOPAC). La mesure du taux de ces deux métabolites dans un liquide biologique peut donner un index indirect de l'activité des neurones dopaminergiques.

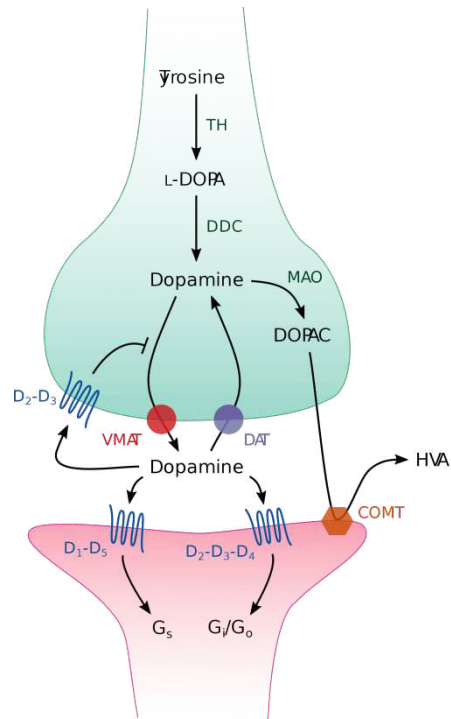


Figure 20 : La synapse dopaminergique (d'après Yves Landry et Jean-Pierre Gies).

Il est à noter que la dopamine est le premier membre de la famille des catécholamines apparaissant dans cette voie de synthèse. Elle peut être hydroxylée par la dopamine- β -hydroxylase (DBH) en noradrénaline, puis méthylée en adrénaline par la phényléthanolamine-N-méthyltransférase (PNMT) (**Figure 21**).

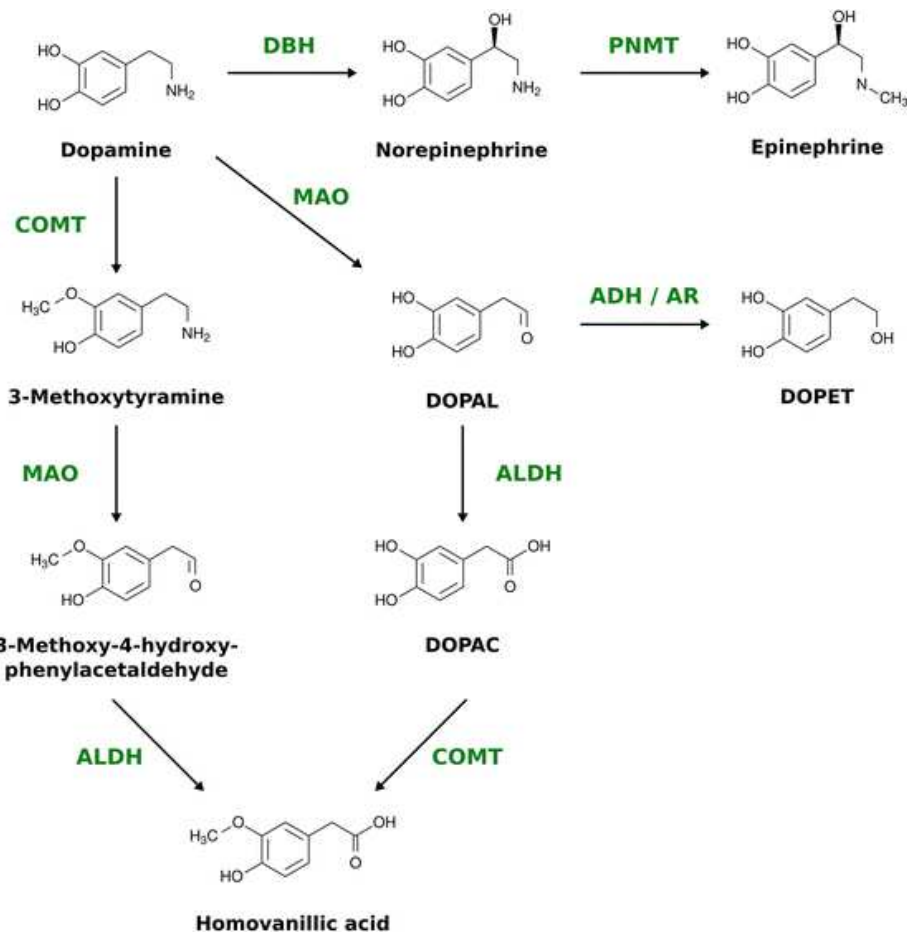


Figure 21 : Voies de dégradation de la dopamine.

1.3 Récepteurs de la Dopamine

Il a été mis en évidence 5 récepteurs à la dopamine, répartis en 2 sous-familles :

- Les récepteurs de type *D1-like* comprenant les récepteurs D1 et D5
- Les récepteurs de type *D2-like* comprenant les récepteurs D2, D3 et D4

L'analyse des séquences d'acides aminés des sous-types de récepteurs a montré qu'il existe de nombreuses homologies entre ceux-ci, et surtout à l'intérieur de chaque sous-famille (**Tableau 2**) [233].

Tableau 2 : Les 5 récepteurs à la dopamine répartis en 2 sous-familles.

	D1-like		D2-like		
	D1	D5	D2	D3	D4
Action I'	↑ Adenylate cyclase		↓ Adenylate cyclase		
Homologie					
- Avec D1	100%	82%	44%	44%	42%
- Avec D2	44%	49%	100	76%	54%
Localisation significative	Postsynapt : - Striatum - Ny accumbens - Tub olfactif - Cortex céréb - Syst limbique - Hypothalamus - Thalamus	Postsynapt : - Hippocampe - Thalamus - Ny mamil lat - Striatum - Cortex cérébral	Postsynapt : - Striatum - Tub olfactif - Ny accumbens - Cortex céréb - Amygdale - Hippocampe - Hypothalamus Présynapt : - Aire tegm vent - Subst noire	Postsynapt : - Tub olfactif - Ny accumbens - Cortex céréb - îlots de Calleja Présynapt : - Aire tegm vent - Subst noire	Postsynapt : - Cortex céréb - Amygdale - Hippocampe - Hypothalamus - Mésencéphale - Rétine Présynapt : - Aire tegm vent - Subst noire

Ces récepteurs répondent à la définition des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) et contiennent chacun 7 hélices transmembranaires d'acides aminés, reliées par 3 boucles extracellulaires (E1-E3) et 3 boucles intracellulaires (E1-E3) [234]. Les récepteurs *D1-like* possèdent une 3^e boucle intracellulaire plus courte et une plus longue extrémité carboxy-terminale en comparaison aux récepteurs *D2-like*. Cette différence est la base de la division des récepteurs dopaminergiques en 2 sous-familles, et signifie probablement une modification de l'interaction récepteur/protéine G. En effet, la 3^{ème} boucle intracellulaire I3 est essentielle pour l'interaction récepteur/protéine G. Le site de fixation du ligand se situe dans la cavité formée entre les hélices transmembranaires. La boucle I3 et l'extrémité carboxy-terminale contient de multiples sites de phosphorylation qui sont impliqués dans la régulation de la réponse du récepteur (**Figure 22**).

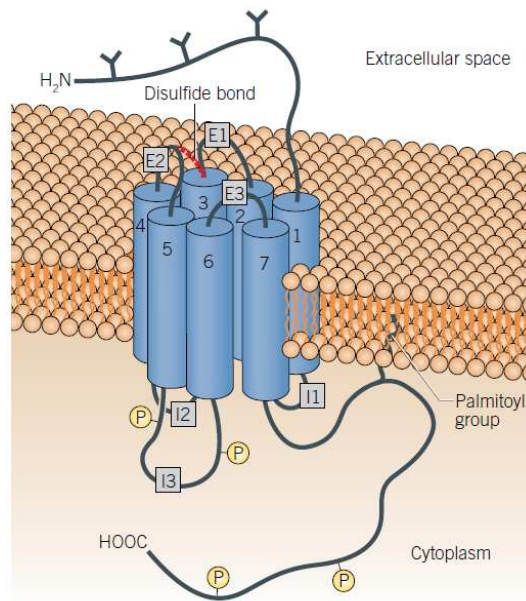


Figure 22 : Récepteur à la dopamine caractéristique des récepteurs couplés aux protéines G (d'après Strange PG and Neve K, Dopamine receptors, Tocris).

La principale activité des récepteurs à la dopamine est la régulation de l'adénylate cyclase via son couplage aux protéines G : les récepteurs *D1-like* sont associés aux sous-unités $G\alpha_s$ alors que les récepteurs *D2-like* sont associés aux sous-unités $G\alpha_i/ G\alpha_o$ (**Figure 23**). Plusieurs voies de transduction peuvent être couplées, via les protéines G, à l'un ou l'autre des récepteurs dopaminergiques : voie de l'adénylate-cyclase, voie de la phospholipase C, voie de l'acide arachidonique, canaux calciques ou potassiques, échangeurs sodium protons ou pompe Na^+-K^+-ATP dépendante. Les signaux de transduction activés par la dopamine qui ont été le mieux décrits sont liés à la modulation de la voie de l'AMP cyclique. L'activation des récepteurs *D1-like* aura tendance à augmenter l'adénylate cyclase et à entraîner une accumulation intracellulaire d'AMPc, alors que les récepteurs *D2-like* diminueront plutôt l'activité de l'adénylate cyclase, diminuant ainsi la concentration d'AMPc [233,235]. L'augmentation de l'AMPc intracellulaire après l'activation des récepteurs *D1-like* a pour conséquence l'activation de la protéine kinase A (PKA) et la phospholipase C. Celles-ci vont ensuite agir sur la phosphorylation de plusieurs cibles, notamment les canaux potassiques, et la DARPP-32, une phosphoprotéine centrale dans la transduction du signal dopaminergique. A l'inverse les récepteurs *D2-like* vont entraîner une diminution de l'AMPc intracellulaire et vont entraîner d'autres actions intracellulaires telles que l'activation de canaux potassiques, la stimulation de la phospholipase A2 et la modulation de canaux calciques [235].

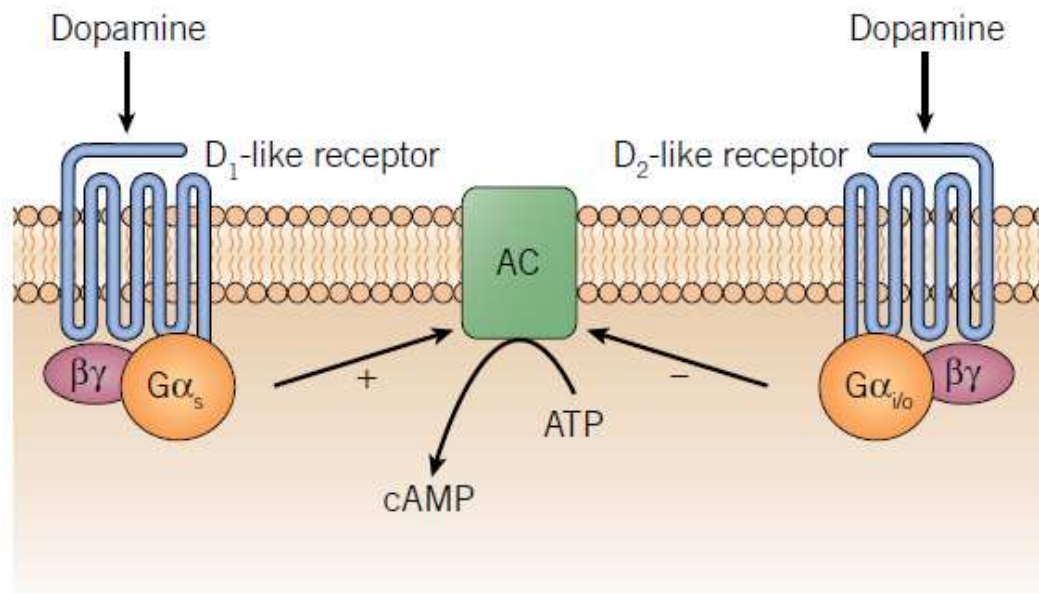


Figure 23 : 2 types de récepteurs à la dopamine. Les récepteurs à la dopamine des 2 sous-familles D₁-like et D₂-like ont des effets différents sur l'adenylate cyclase, modifiant ainsi la concentration intracellulaire d'AMPc (d'après Strange PG and Neve K, Dopamine receptors, Tocris).

1.4 Voies dopaminergiques cérébrales

La dopamine est principalement produite dans la substance noire et dans l'aire tegmentale ventrale [236], situées dans le mésencéphale. Bien que les neurones dopaminergiques concernent moins de 1 % de l'ensemble des neurones, ce neurotransmetteur joue un rôle modulateur final essentiel des sorties motrices et psychiques. Il existe 4 grandes voies de projection des neurones dopaminergiques (**Figure 24**) [237,238].

La voie nigro-striée

Les neurones dopaminergiques de la *pars compacta* de la substance noire projettent majoritairement dans la partie supérieure du striatum, constituée du noyau caudé et du putamen. La voie nigrostriée est la voie dopaminergique la plus peuplée en neurones. Ce réseau représente un système modulateur des aires corticales motrices et intervient dans le phénomène de contrôle des fonctions motrices [239]. Cette voie est atteinte lors d'une maladie de Parkinson [240].

La voie mésolimbique

Cette voie contient les projections dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale du mésencéphale qui ont pour cible la région ventrale du striatum, constituée du noyau accumbens, de la stria terminalis, des tubercules olfactifs, du septum, de l'amygdale et de l'hippocampe. Ce réseau représente le système de récompense et participe ainsi au contrôle des processus motivationnels. Il est fortement impliqué dans les situations d'addiction et de dépendance aux substances récréatives [241,242].

La voie mésocorticale

Cette voie contient les projections dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale du mésencéphale qui ont pour cible la région ventrale du striatum, le cortex frontal et ventral, en particulier sur le gyrus cingulaire antérieur, l'aire entorhinale et le cortex préfrontal. Elle joue un rôle dans la concentration ainsi que sur des fonctions exécutives comme la mémoire de travail [243].

La voie tubéro-infundibulaire

La dopamine joue aussi un rôle de neuro-hormone au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Cette voie a son origine dans l'hypothalamus et projette sur l'éminence médiane où la dopamine est relâchée dans la veine porte antéhypophysaire. Elle inhibe la libération de prolactine par l'hypophyse antérieure [244].

Les voies dopaminergiques

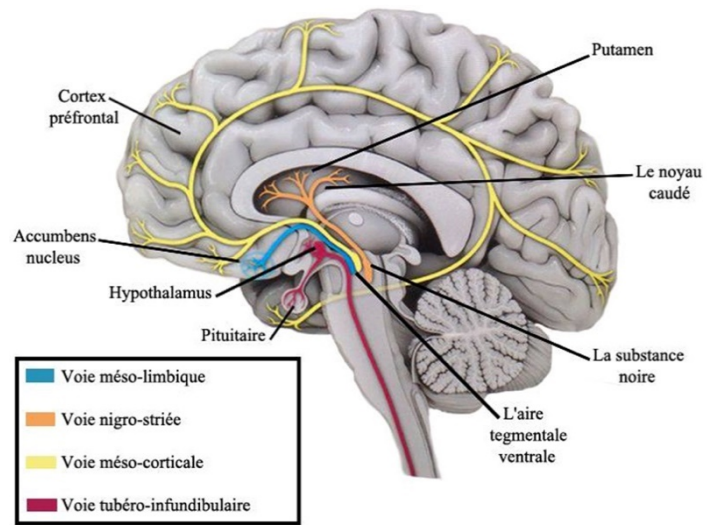


Figure 24 : Voies de projection des neurones dopaminergiques (adapté de Arias-Carrion et al. [237]).

II. ROLE DE LA DOPAMINE RETINIENNE

2.1 Sécrétion de la Dopamine

La dopamine est l'un des principaux neuromédiateurs dans la rétine et ses rôles semblent être multiples et fortement liés à la stimulation lumineuse [245,246]. Le lieu de production de la dopamine se situe dans les cellules dopaminergiques qui se localisent au sein de la couche des cellules amacrines, à la limite de la nucléaire interne et de la plexiforme interne (**Figure 25**).

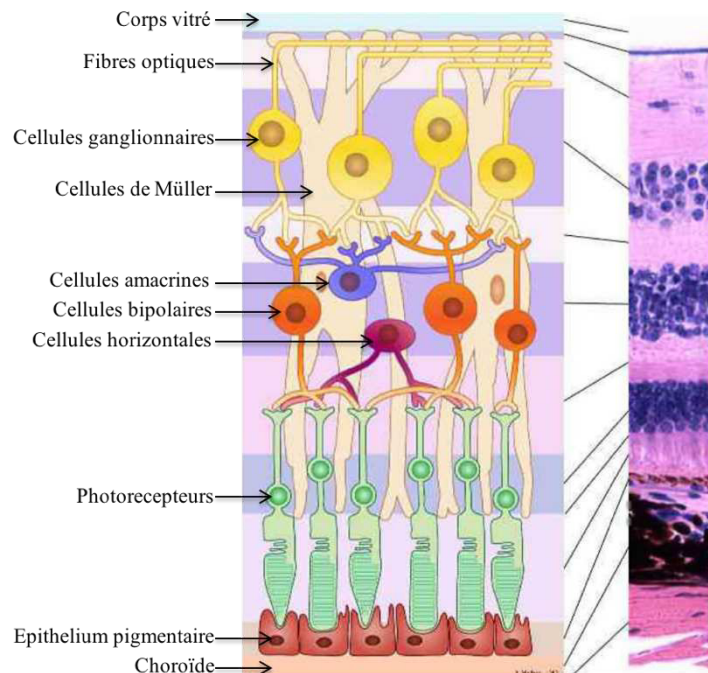


Figure 25 : Schématisation d'une coupe histologique de la rétine. Les cellules dopaminergiques se situent dans la couche des cellules amacrines (illustration : *A.Micheau*. <https://www.imaios.com/fr/e-Anatomy>).

La densité de ces neurones dopaminergiques est faible (environ 10-100/mm²), mais chaque cellule peut donner de multiples axones qui irradient aussi loin que ceux de la cellule dopaminergique voisine [247–249]. Ces cellules représentent moins de 1% de la population de cellules rétiniennes. Elles sont distribuées de manière homogène dans les 4 quadrants de la rétine [250]. Leur nombre est relativement bien conservé entre les individus et il existe peu de variations. Ces cellules sont appelées dopaminergiques car elles contiennent la TH, enzyme limitante dans la synthèse de la dopamine. Ainsi, la TH et la dopamine sont retrouvées sur toute la surface de la cellule, y compris dans les parties terminales des axones (**Figure 26**). Ceci indique que la cellule dopaminergique peut synthétiser, et probablement relarguer la dopamine, à n'importe quel point le long de son axone [251].

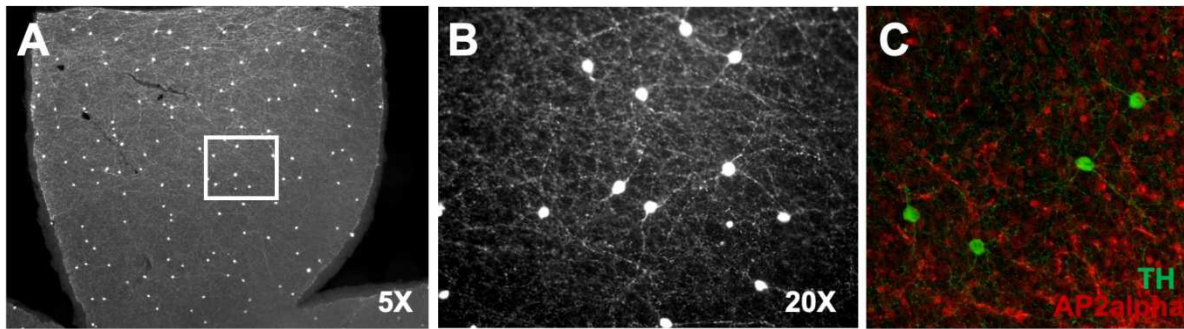


Figure 26 : Neurones dopaminergiques réiniens. Montage à plat de rétine de souris avec marquage TH caractéristique des cellules synthétisant la dopamine (A, B et C), et AP2alpha (C) marquant une majorité des cellules amacriennes (Images T.Mathis, institut de la Vision, UPMC, Paris).

Bien que la dopamine puisse stimuler certaines cellules amacriennes via des synapses bien établies entre cellules dopaminergiques et amacriennes [252], la majorité des interactions avec les autres cellules réiniennes passe par la diffusion de la molécule à travers la rétine. La profondeur de cette diffusion est difficile à évaluer, d'autant plus qu'une fraction des cellules dopaminergiques possède des axones plongeant plus profondément dans les couches réiniennes jusqu'à la plexiforme externe, où elle termine proche des photorécepteurs, des cellules bipolaires et des cellules horizontales [252–254]. La séparation spatiale de la source de synthèse de la dopamine dans les cellules dopaminergiques, et la localisation de ses récepteurs réiniens, est probablement la meilleure preuve de ce mécanisme de diffusion [255]. Une autre approche pour comprendre le comportement diffusif de la molécule est de calculer le ratio entre ses métabolites et la dopamine elle-même. La dopamine peut être recaptée par le neurone dopaminergique lui-même et être métabolisée via la MAO et d'autres enzymes aboutissant à la DOPAC. Le ratio Dopamine/DOPAC est donc un bon indicateur du cycle de la dopamine. Dans le striatum, où les axones des cellules dopaminergiques s'enfoncent au plus proche contact des autres cellules, le ratio Dopamine/DOPAC est très faible, de l'ordre de 1:1000, ce qui signifie que 999 des 1000 molécules de dopamine sont recapturées et métabolisées par ces cellules dopaminergiques. Dans la rétine, le ratio Dopamine/DOPAC est beaucoup plus élevé de l'ordre de 1:1, indiquant que 50% de la dopamine échappe à la recapture car elle a probablement diffusé au travers les couches réiniennes [256,257].

La concentration extracellulaire en dopamine dans la rétine a été estimée entre 100 et 1000 nM [257], ce qui correspond à la gamme de concentration permettant l'activation des récepteurs à la dopamine [258,259]. La sensibilité différente à la dopamine des récepteurs à la dopamine

explique aussi leur localisation spatiale. La concentration locale de la dopamine est dépendante de sa diffusion au travers de barrières biologiques et de la distance par rapport à sa source de production. Ainsi, les récepteurs D5 sont environ 10 fois plus sensibles à la dopamine que les D1 [260], et peut expliquer que ce sous-type de récepteur soit retrouvé en nombre plus important sur les cellules de l'EPR, qui est la cellule rétinienne la plus distante de la zone de production de dopamine. De la même manière, le fait que les récepteurs D2-like soient plus sensibles à la dopamine que les D1-like permet à ceux-ci d'être stimulés plus finement par des petites différences de concentration de dopamine liées à des faibles luminosités (**Tableau 3**) [261,262].

Tableau 3 : Propriété pharmacologique des sous-types des récepteurs à la dopamine (DR) : constante d'inhibition K_i (nM).

	DR1	DR2	DR3	DR4	DR5
Dopamine	2340	228	1705	27	450

2.2 Croissance de l'œil

Depuis la première publication indiquant un lien entre la dopamine et le contrôle de la croissance oculaire en 1989 [263], de nombreux travaux ont corroboré cette hypothèse. Ainsi la sécrétion de dopamine dans l'œil préviendrait l'apparition d'une myopie en agissant tel un signal « stop » sur la croissance oculaire. En effet, il a été mis en évidence que le taux de dopamine et de DOPAC diminuait dans les yeux d'animaux soumis à des modèles d'induction de myopie [264–267]. L'augmentation de dopamine par injection de la molécule directement dans l'œil ou par l'administration systémique de L-DOPA préviendrait l'apparition de myopie dans des modèles animaux [268–270].

Dans les études épidémiologiques de population, il semblerait que les enfants passant plus de temps à l'extérieur, et donc plus illuminés par la lumière du jour, développeraient moins de myopie que les autres [271–273]. Cet effet protecteur de la lumière a été confirmé par des expérimentations animales [274–276]. Cette association entre lumière et prévention de la croissance myopique de l'œil pourrait être liée au fait que la synthèse de dopamine dans la rétine, ainsi que son relargage, soient stimulés par la lumière [245,246].

Il semblerait que l'effet sur la croissance oculaire soit la résultante d'une activation différentielle des récepteurs D1-like et D2-like (**Figure 27**). La myopie se développerait si les récepteurs D2 se retrouvent plus stimulés que les D1 [277]. La localisation précise du site d'action de la dopamine pour limiter cette croissance de l'œil n'est pas connue. En effet, il semblerait peu probable que la dopamine atteigne directement les chondrocytes de la sclère pour réaliser son effet. Une autre hypothèse serait que l'EPR serve de relai avec l'émission d'un second messager en direction de la sclère. Il a été montré une augmentation des mitoses des chondrocytes scléaux lorsque ceux-ci étaient mis en co-cultures avec des cellules d'EPR. L'ajout d'apomorphine, un agoniste dopaminergique, à ces co-cultures entraînait une diminution de ce taux de mitoses, alors que ce traitement n'entraînait pas d'effet sur des monocultures de chondrocytes scléaux seuls, démontrant ainsi le rôle relais de l'EPR [278].

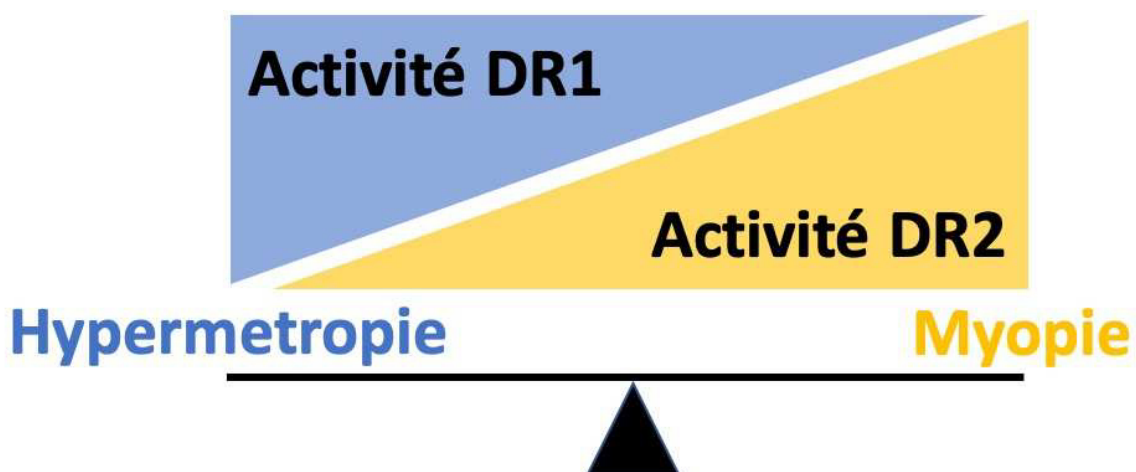


Figure 27 : Action de la dopamine sur la croissance oculaire (d'après Zhou et al. [277]).

2.3 Rythme circadien

La rétine n'est pas seulement un système sensitif qui relaie l'information lumineuse au cerveau, elle a aussi son propre système circadien indépendant des influences d'autres systèmes. Tandis que les photorécepteurs de type cônes sont responsables de la vision diurne et des couleurs, les bâtonnets sont utilisés pour la période nocturne et la pénombre. Il existe ainsi une régulation circadienne des interactions entre cônes et bâtonnets. L'électrorétinogramme (ERG) a confirmé cette dynamique entre nuit et jour sur la dominance des cônes ou bâtonnets. Pourtant, il apparaît que des animaux placés dans l'obscurité totale conservent toujours ce rythme circadien de dominance, indiquant que la lumière n'est pas le seul régulateur de ce cycle. Ce processus

rythmique est majoritairement gouverné par l'horloge circadienne des photorécepteurs et le changement de dominance semble modulé par la dopamine.

La mélatonine, reconnue comme l'hormone de régulation des rythmes circadiens, produite surtout la nuit, a été retrouvée dans la rétine. Elle est synthétisée et sécrétée par les photorécepteurs chez les espèces vertébrées et chez la plupart des mammifères [279–284]. La transcription de l'arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT), enzyme clé de la synthèse de mélatonine, est sous contrôle circadien [282,283,285]. Ainsi la concentration de la mélatonine rétinienne est plus haute la nuit que le jour. Pourtant, chez l'homme, la capacité de la rétine à produire de la mélatonine est toujours débattue. Cela peut être lié en partie au fait que la mélatonine relarguée par la glande pinéale la nuit atteint aussi la rétine via la circulation sanguine [279]. Ainsi, il est difficile de connaître avec certitude le lieu de production de cette mélatonine. Toutes les cellules rétinienne expriment des récepteurs à la mélatonine et pourraient donc être régulées par cette hormone [280,286].

La synthèse de la mélatonine n'est pas uniquement gouvernée par l'horloge circadienne des photorécepteurs. En effet, la lumière et la dopamine sont capables d'inhiber cette production et cette sécrétion de mélatonine. Il a été montré que la lumière pouvait augmenter la production de dopamine par les cellules amacrines dopaminergiques [245,246]. La dopamine ainsi produite semble inhiber la production de mélatonine par le photorécepteur via des récepteurs D2-positionnés sur ces cellules [287]. Ainsi, les récepteurs D2 et D4 (le récepteur D3 étant absent de la rétine), pourraient servir à moduler le rythme circadien de la rétine selon l'intensité lumineuse. De manière inverse, il a été montré que la mélatonine pouvait inhiber la synthèse de dopamine par les cellules amacrines de la rétine qui présentent des récepteurs de type MT1 [286]. Ainsi la nuit, lorsque la concentration de mélatonine est maximum dans la rétine, la sécrétion de dopamine s'en retrouve réduite [285,288,289].

La mélatonine et la dopamine servent ainsi de signal « jour » et « nuit » dans la rétine. Ces 2 molécules sont toujours en phase opposée : la concentration de dopamine est haute la journée et basse la nuit, tandis que la concentration de mélatonine est basse le jour et haute la nuit. La synthèse et le relargage de dopamine dans la rétine est modulée par la lumière [245,246], et permet de moduler la vision diurne de la rétine en augmentant la sensibilité au contraste et la résolution spatiale [290]. Cette modulation de la vision qui permet de réaliser un *shift* vision nocturne – vision diurne passerait par une adaptation des *gap junctions* entre les cônes et les bâtonnets. En effet, même si les synapses entre un photorécepteur et une cellule bipolaire est cône-bâtonnet spécifique, ces 2 types de photorécepteurs sont anatomiquement connectés et

couplés par un système de jonctions qui peut jouer le rôle de synapse [291,292]. Cela signifie qu'il existe un lien entre les cônes et les bâtonnets. Les bâtonnets en pleine obscurité utilisent un réseau spécifique qui va conduire le message visuel du photorécepteur à la cellule ganglionnaire. En ambiance mésopique, comme à l'aube ou au crépuscule, les bâtonnets peuvent utiliser une autre voie qui implique un couplage électrique avec les cônes, et ainsi emprunter la voie de ce dernier type de photorécepteur. Ce couplage est assez puissant la nuit mais diminue et devient faible pendant la journée [293]. Cette modulation du couplage est rythmique et est en partie médiée par la régulation circadienne de la phosphorylation de la connexin 36, protéine de la *gap junction* entre les bâtonnets et les cônes, dans laquelle la phosphorylation est plus forte la nuit que le jour [294]. Ce couplage est aussi modulé par la dopamine et notamment par l'action de récepteurs de type D2-like [285]. En l'absence de mélatonine, la concentration rétinienne en dopamine perd son rythme nycthéral [281,294–296]. En l'absence de dopamine, les réponses électriques mesurées par ERG chez un œil adapté à la lumière sont considérablement réduites alors que les réponses à l'obscurité apparaissent normales.

Ainsi, le rythme circadien oculaire possède une partie non dépendante de la lumière et agit via l'action de la mélatonine. La sécrétion de dopamine, augmentée par la luminosité permet de réguler ce cycle par l'inhibition du relargage de mélatonine par les photorécepteurs (**Figure 28**).

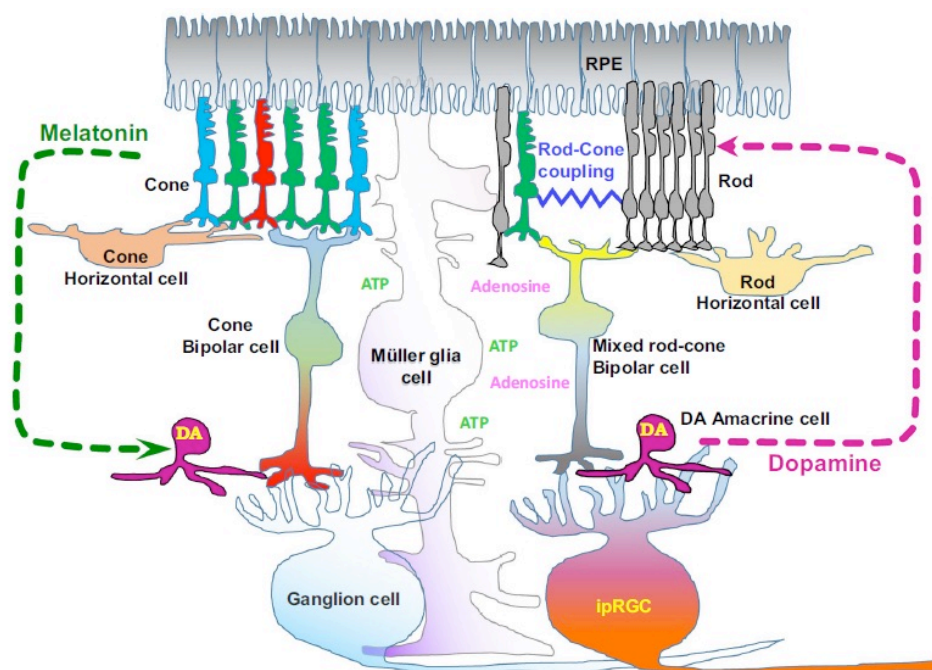


Figure 28 : Cycle circadien dans la rétine : rôle de la dopamine et de la mélatonine. Toutes les cellules rétinienne ont des oscillateurs circadiens. Les photorécepteurs relarguent la mélatonine la nuit qui inhibe la sécrétion de dopamine par les cellules amacrines dopaminergiques. Pendant la journée, la dopamine relarguée par les cellules amacrines inhibe la synthèse de la mélatonine et son relargage par les photorécepteurs. Il inhibe aussi le couplage cône-bâtonnet qui se produit la nuit entre les photorécepteurs (d'après Ko et al. [285]).

2.4 Modulation du message visuel

La dopamine possède aussi un rôle de modulation du message visuel en agissant sur les autres cellules amacrines et plus particulièrement sur les cellules AII qui modulent l'information visuelle venant des bâtonnets. La dopamine agirait via des récepteurs D1 situés sur les cellules AII. En diminuant le couplage électrique entre les cellules amacrines l'information visuelle véhiculée par les bâtonnets serait ainsi modulée. Ce mécanisme additionnel va réduire encore plus le signal des bâtonnets et montre que la dopamine agit en tant que neuromessager de l'adaptation à la lumière [297,298]. Cette hypothèse a été vérifiée par l'analyse de l'ERG et du pattern-ERG reflétant plus l'activité de la rétine interne. Il est à noter que la dopamine a tendance à diminuer les ondes b scotopique sur l'ERG et que des antagonistes D1 et D2 augmentent ces ondes scotopiques, reflétant donc l'activité des bâtonnets [299,300]. Il a aussi été retrouvé que la dopamine agissait sur les cellules horizontales et les cellules ganglionnaires [298]

L'ensemble de ces données semblent suggérer que la dopamine agit pour supprimer le signal venant du circuit des bâtonnet, en augmentant le circuit des cônes. L'augmentation de la concentration en dopamine à la lumière contribue ainsi à augmenter la sensibilité de la rétine à la lumière dès le lever du jour.

2.5 Phagocytose

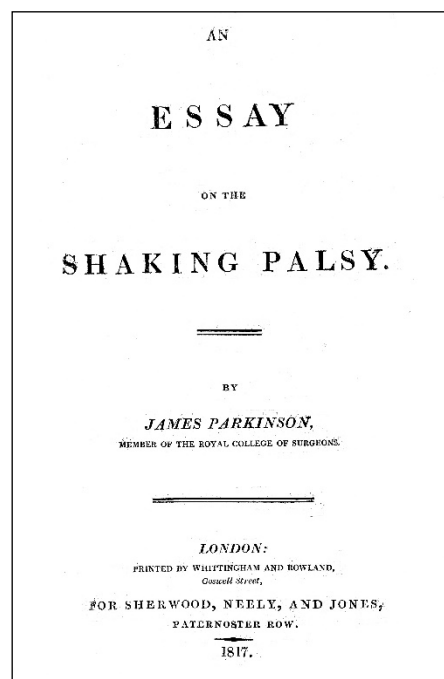
Les cellules de l'EPR sont indispensables à la survie des photorécepteurs en maintenant leur cohésion, en assurant leur alimentation et leur maintenance. Pour ce dernier point, la cellule épithéliale joue le rôle de macrophage pour les photorécepteurs dont les disques des segments externes sont en renouvellement constant. Ainsi, les cellules de l'EPR sont capables de phagocyter un disque complet en neuf jours [301]. Cette phagocytose est obligatoire pour le fonctionnement normal du photorécepteur. Les articles externes gardent une longueur

sensiblement constante [302], grâce à un équilibre entre croissance à partir de leur partie proximale au niveau du cil, et phagocytose de leur partie distale par l'EPR [303].

Plusieurs substances neuro-actives sécrétées par la rétine peuvent influencer le rythme et l'intensité de la phagocytose. Il a été montré que l'augmentation du taux d'AMPc dans la cellule d'EPR était corrélée à une diminution de l'activité de phagocytose [304]. La dopamine, qui joue aussi sur les cycles circadiens rétiens, a un rôle sur la modulation de la phagocytose passant par des récepteurs *D1-like*. Ce résultat a été montré chez la souris où des agonistes *D1-like* ont montré une diminution de l'activité de phagocytose au même niveau que des activateurs de l'adenylate cyclase [305].

III. MALADIE DE PARKINSON

La maladie de Parkinson est la deuxième maladie neurodégénérative cérébrale après la maladie d'Alzheimer. La prévalence de la maladie est d'environ 2 pour 1000 habitants pour la population générale mais atteints 1 à 2% des patients de plus de 60 ans. Si cette maladie chronique atteint plus généralement les hommes et débute entre 55 et 65 ans, elle peut survenir à tout âge [306]. Le nombre de patients atteints de la maladie de Parkinson s'accroît progressivement compte tenu du vieillissement constant de la population. Elle a été décrite pour la première fois en 1817 par James Parkinson, qualifiant l'atteinte comme une « paralysie agitante » (*shaking palsy*) [307]. Au fur et à mesure du temps, la symptomatologie et les signes cliniques de cette affection ont été précisés et regroupés en signes moteurs et signes non-moteurs [308]. Le diagnostic de la maladie est clinique mais une imagerie cérébrale et un bilan sanguin éliminant d'autres causes d'atteintes neurologique (Syphilis, maladie de Lyme, ...) est souvent prescrit, notamment si d'autres étiologies sont suspectées. La scintigraphie cérébrale permet dans les cas douteux de montrer l'atteinte du striatum [309].



3.1 Signes cliniques

3.1.1 Troubles moteurs

Les troubles moteurs sont reconnus comme étant les signes cardinaux de la maladie. Ils se répartissent en 4 grands symptômes, associés à des degrés différents. Ils sont variables dans le temps et peuvent être influencés par les émotions, le stress et les stimuli sensoriels :

Le tremblement de repos est le signe le plus caractéristique de la maladie. Il s'agit d'un tremblement régulier, lent, prédominant au niveau des extrémités supérieures. Il est plus important au repos et lors des efforts de concentration mais disparaît lors des mouvements et dans la période de sommeil.

La rigidité plastique est une hypertonie musculaire extrapyramidale. Elle cède à l'appui lors de la mobilisation passive du membre et par à-coups (aspect en roue dentée). Elle donne l'attitude caractéristique des patients parkinsoniens en flexion avec cyphose dorsale et membres semi-fléchis.

L'akinesie et la bradykinesie correspondent à la raréfaction ou à l'absence du mouvement, ainsi qu'à la lenteur de son exécution. Les mouvements involontaires tels que les mimiques ou l'initiation de la marche sont limités donnant l'aspect « figé » au patient atteint de la maladie de Parkinson. La démarche d'un patient malade se caractérise par une avancée lente, à petits pas, avec diminution du balancement des bras.

L'instabilité posturale est plus tardive dans l'évolution et se définit par des troubles de l'équilibre pouvant entraîner des chutes.

3.1.2 Troubles non-moteurs

Bien que les troubles moteurs soient au premier plan dans la maladie, d'autres symptômes qualifiés de « troubles non-moteurs » peuvent survenir et même plus précocement. Ces troubles sont généralement moins prononcés mais peuvent grandement affecter la qualité de vie des patients.

Les perturbations cognitives et de l'humeur se traduisent par des pertes de mémoire, des temps de réaction ralentis et le développement d'un syndrome frontal. Modérés en début de la maladie, ils évoluent ensuite vers une démence chez 20 à 40% des patients. Parfois, ces démences sont accompagnées de psychose qui se manifestent par des hallucinations visuelles. Les troubles de

l'humeur se manifestent par une dépression qui affecte plus de la moitié des patients et qui survient volontiers dès le début de la maladie.

Les perturbations sensorielles font références en grande partie aux troubles olfactifs qui surviennent tôt dans l'histoire de la maladie. S'y associent parfois des difficultés visuelles dans la discrimination des contrastes et couleurs et des vertiges [310]. Il peut aussi exister des troubles moteurs tels que des anomalies du système des saccades [311] ou des anomalies de la poursuite et de la fixation [312].

Les perturbations du sommeil sont très fréquentes avec selon les études des prévalences pouvant atteindre la quasi-totalité des patients. Ces troubles se caractérisent par une inversion du cycle nyctéméral se traduisant par une dérégulation des cycles veille/sommeil avec des insomnies, des parasomnies et une réduction du sommeil paradoxal.

Les perturbations du système nerveux autonome comprennent des troubles intestinaux (constipation, dysphagie, nausées, ...), des troubles vésico-sphinctériens (incontinence) et des troubles sexuels.

3.2 Étiologies

La cause de la mort neuronale et ses mécanismes dans la maladie de Parkinson ne sont pas encore connus. De nombreuses hypothèses voient le jour mais il semble que la physiopathogénie soit multifactorielle associant prédisposition génétique et facteurs environnementaux.

3.2.1 Facteurs génétiques

L'hypothèse d'une anomalie génétique comme substratum au développement d'une maladie de Parkinson a été avancée devant la découverte de cas familiaux de la maladie. En effet, l'antécédent familial confère un risque allant jusqu'à 20% de développer la maladie. Plusieurs gènes ont été identifiés et semblent contribuer au développement plus fréquent de l'atteinte : mutation du gène de l' α -synucléine, gènes agissant sur le fonctionnement mitochondrial (pink1), gènes agissant sur le système ubiquitine-protéasome (parkine, UCH-L1). Plus récemment une mutation du gène LRRK-2 a été retrouvée associée à la maladie [313].

3.2.2 Facteurs environnementaux

L'exposition aux pesticides augmenterait significativement le risque de développer une maladie de Parkinson. Ainsi les organochlorées, la roténone, et d'autres molécules ont été retrouvés associés au développement des symptômes de la maladie [314]. Certaines expositions professionnelles chroniques comme le manganèse ont été rapportées comme étant un facteur de risque de développer des syndromes de Parkinson [315]. La consommation de certains aliments tels que le corossol [316] et la noix de cycade [317] pourrait provoquer des symptômes ressemblant à la maladie de Parkinson qui seraient réversibles à l'arrêt de l'intoxication.

Mais c'est surtout l'intoxication au MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), une drogue récréative utilisée dans les années 1980 qui a montré l'influence de facteurs environnementaux dans l'apparition d'un syndrome de Parkinson [318]. Ce dérivé de l'héroïne, utilisé par injection intraveineuse, provoque l'apparition d'une maladie de Parkinson sévère quelques jours après l'injection. Les études anatomopathologiques ont révélé une perte quasi exclusive des neurones dopaminergiques de la *pars compacta* dans la substance noire montrant l'extrême spécificité de cette intoxication passant par la DAT [318,319].

3.3 Physiopathologie

La maladie de Parkinson se caractérise par une dégénérescence des neurones dopaminergiques touchant principalement ceux de la *pars compacta* dans la substance noire (**Figure 29**).

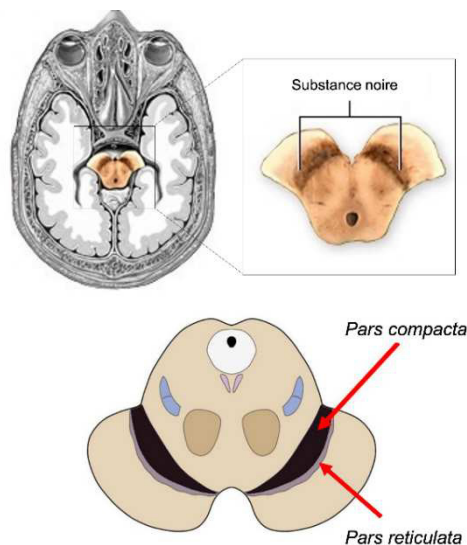


Figure 29 : Localisation de la substance noire et de la *pars compacta*.

Cette altération va induire une diminution du nombre de neurones dopaminergiques et un déficit en dopamine, expliquant les principaux symptômes cliniques de la maladie (**Figure 30**). La substance noire, appelée aussi *locus niger*, fait partie des noyaux de la base. Son nom vient des cellules qui le compose qui contiennent de la neuromélanine, un composé pigmenté. La substance noire se divise en *pars compacta* et *pars reticulata*. La *pars compacta* est composée de neurones dopaminergiques qui vont ensuite projeter vers le striatum, et notamment le noyau caudé et le putamen. La *pars reticulata* est quant à elle composée de neurones GABAergiques inhibiteurs qui vont se projeter sur le thalamus ainsi que d'autres noyaux centraux.

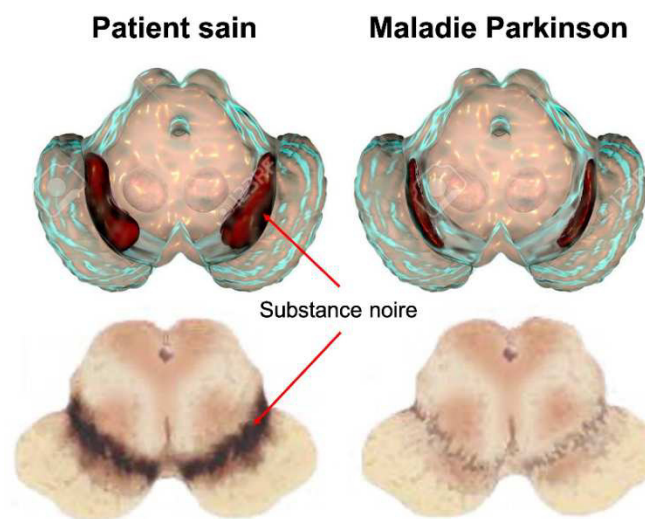


Figure 30 : Représentation anatomopathologique de la perte en cellules dopaminergiques lors de la maladie de Parkinson.

La maladie de Parkinson fait partie, d'un point de vue anatomopathologique, au groupe des synucléinopathies qu'elle partage avec la démence à corps de Lewy et l'atrophie multi-systématisée, ainsi que d'autres maladies plus rares. Ces pathologies ont la même base pathologique, c'est-à-dire la présence anormale d'agrégats l' α -synucléine, formant des inclusions neuronales éosinophiles cytoplasmiques appelées corps de Lewy [320].

3.3.1 L' α -synucléine

L' α -synucléine est une protéine de 14-19 kDa dont l'expression est abondante dans tout le système nerveux [321]. Elle est localisée dans le soma et le noyau cellulaire mais a surtout été retrouvée en quantité plus importante dans le terminal présynaptique. La fonction normale de cette protéine n'est pas connue et aucun rôle spécifique ne lui est attribuée. Cependant, comme sa localisation préférentielle est présynaptique et qu'elle a été retrouvée augmentée lors

d'expérimentation d'apprentissage chez l'oiseau (Diamant marin, *Taeniopygia guttata*), elle pourrait jouer un rôle fonctionnel et de plasticité synaptique [322–324]. D'autres fonctions ont été avancées telles qu'un rôle dans les voies de signalisation intracellulaire, la régulation du transporteur à la dopamine, et la synthèse de la dopamine [325].

Le mauvais repliement de l' α -synucléine et son agrégation serait à l'origine des maladies de type α -synucléopathie. Il pourrait faire suite à des facteurs génétiques et environnementaux qui ne sont pas élucidés à ce jour. Cette mauvaise conformation protéique donnerait lieu à l'accumulation d'agrégats protéiques. Ces agrégats se regroupent ensuite formant les caractéristiques corps de Lewy [326]. Ces inclusions sont sphériques et mesurent entre 5 et 25 μ m de diamètre et sont présentes dans les corps cellulaires des neurones atteints (**Figure 31**).

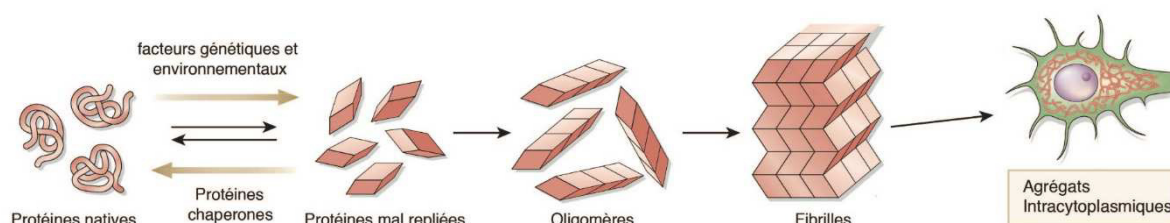


Figure 31 : Schématisation du mauvais repliement de l' α -synucléine et formation d'agrégats intracytoplasmiques (adapté depuis Forman et al. [327]).

Dans la maladie de Parkinson, les corps de Lewy sont présents dans les neurones dopaminergiques de la substance noire mais ils sont aussi retrouvés dans le reste du cerveau [328,329]. Il est difficile de déterminer si la présence des corps de Lewy est la cause ou la conséquence de la souffrance cellulaire ou s'ils participent au processus dégénératif.

3.3.2 Déficit en dopamine

La dégénérescence des neurones dopaminergiques, principalement localisés au niveau de la *pars compacta* de la substance noire, est le *primum movens* des symptômes liés à la maladie de Parkinson. Cette altération neuronale va entraîner une diminution du taux de dopamine au niveau du striatum et des ganglions de la base, lieu de projection principal de ces neurones dopaminergiques. Les symptômes de la maladie apparaissent lorsque la perte cellulaire au sein de la substance noire dépasse 50%, entraînant une baisse du taux de dopamine de 75% [330–332]. La première voie touchée par ces atteintes est la voie nigro-striée qui se projette vers les parties motrices du striatum [333]. Cependant, au cours de la maladie, l'ensemble des voies

dopaminergiques vont être altérées expliquant la diversité des symptômes moteurs et non-moteurs [334,335].

En plus du système dopaminergique, d'autres altérations ont été mises en évidence dans la maladie de Parkinson, faisant de celle-ci une affection neurodégénérative diffuse. Il a ainsi été retrouvé une perte des neurones noradrénergiques du *locus coeruleus* [336], une perte des neurones cholinergiques du noyau basal de Meyner [329] et une perte des neurones sérotoninergiques du raphé [337]. Ces pertes expliquent en partie le large tropisme des symptômes des patients atteints de la maladie de Parkinson.

3.4 Traitement

A l'heure actuelle, et comme dans beaucoup d'autres pathologies neurodégénératives, il n'existe pas de traitement curatif, ni même préventif de la maladie. Les traitements proposés aux patients atteints de la maladie de Parkinson visent essentiellement à diminuer les symptômes de la maladie en palliant le déficit de dopamine. Ces traitements symptomatiques peuvent être médicaux ou chirurgicaux

3.4.1 Traitement médical

Les traitements médicaux peuvent agir sur 3 approches pour suppléer le déficit de dopamine :

- Favoriser la production de dopamine par les neurones dopaminergiques restant par l'apport exogène de L-DOPA
- Stimuler les récepteurs dopaminergiques par des agonistes dopaminergiques
- Réduire le catabolisme de la dopamine à l'aide d'inhibiteurs enzymatiques

3.4.1.1 La Levodopa (L-DOPA)

La dopamine ne peut pas être directement utilisée en tant que traitement car elle ne passe pas la BHR et ne peut ainsi pas atteindre les récepteurs dopaminergiques au niveau cérébral. De plus, ses effets secondaires sont trop importants pour en faire un traitement au long cours chez les patients (nausées, vomissements, hypotension orthostatique). C'est dans les années 1960, avec la découverte de la L-DOPA que le traitement de la maladie de Parkinson a pris un tournant

majeur. Une administration par voie orale permettait de réduire de manière significative les symptômes de la maladie à court et long terme. La L-DOPA est le précurseur de la dopamine capable de traverser la BHE. Une fois présente au niveau cérébral, la L-DOPA est captée par les neurones dopaminergiques restants où elle est transformée en dopamine par décarboxylation via la DDC afin d'être libérée dans la fente synaptique, stimulant ainsi les récepteurs dopaminergiques. La L-DOPA est systématiquement associée à un inhibiteur de la DDC (Benserazide ou Carbidopa) qui ne franchi pas la BHE, et permet d'éviter la décarboxylation périphérique de la molécule [338–343]. La réduction de la métabolisation périphérique de la molécule en dopamine, diminue ainsi ses effets secondaires. Cela permet aussi d'améliorer le passage de la BHE par la L-DOPA réduisant ainsi la dose requise pour un même effet (**Figure 32**). Au fur et à mesure du traitement, les effets bénéfiques de la L-DOPA diminuent et de plus en plus d'effets secondaires apparaissent tels que des fluctuations motrices, ou des dyskinésies [344].

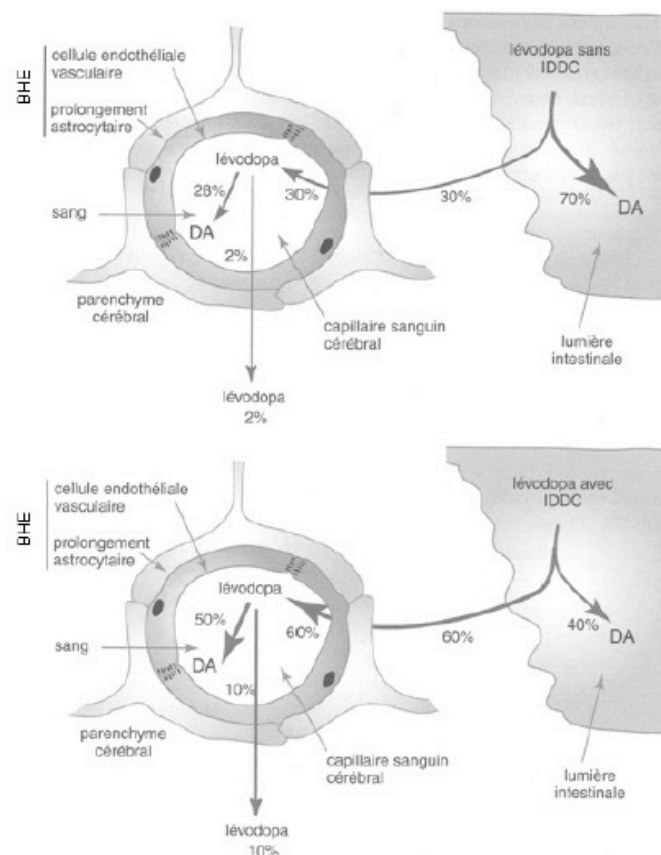


Figure 32 : Rôle des inhibiteurs de la décarboxylase périphérique (IDDC) sur le passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE) par la levodopa (L-DOPA).

3.4.1.2 Agonistes dopaminergiques

Ce sont des analogues structuraux de la dopamine qui agissent sur ses récepteurs centraux ou périphériques. Néanmoins, l'effet de ces traitements est moins important que celui de la L-DOPA et provoque plus fréquemment des effets secondaires en raison de la stimulation directe des récepteurs dopaminergiques périphériques. Ils se subdivisent en 2 groupes : les agonistes dopaminergiques ergotés, dont la structure chimique dérive des alcaloïdes de l'ergot de seigle (Bromocriptine, Lisuride, Pergolide,...), et les non ergotés (Amantadine, Apomorphine, Piribédil, Ropinirole,...). Toutes ces molécules ont la particularité d'être des agonistes des récepteurs D2, certaines ayant une action supplémentaire sur D1, qu'elle soit agoniste ou antagoniste. Ces traitements peuvent être prescrits au début de la maladie mais leur dosage doit être limité afin d'éviter les effets secondaires périphériques de la dopamine. Ils peuvent aussi être associés à la L-DOPA afin de compléter son activité.

3.4.1.3 Inhibiteur du catabolisme de la dopamine

Les inhibiteurs de la dégradation enzymatique de la dopamine peuvent aider à prolonger l'effet thérapeutique de la L-DOPA. Ainsi les inhibiteurs de la COMT (Entacapone) ou de la MAO-B (Sélégiline, Rasagiline) peuvent être prescrits en association à la L-DOPA.

3.4.1.4 Autres traitements : les anticholinergiques

Les anticholinergiques étaient auparavant prescrits pour permettre de réduire l'hyperactivité cholinergique striatale, consécutive à la perte de l'influence dopaminergique inhibitrice sur ces neurones. Ils étaient alors utilisés pour diminuer certains types de tremblements liés à la maladie au prix d'effets secondaires importants (constipation, rétention urinaire, glaucome, sécheresse buccale, ...). Depuis la découverte de la L-DOPA ils sont largement moins prescrits mais peuvent garder une indication en association avec la L-DOPA dans les formes où les tremblements sont prédominants

3.4.2 Traitement chirurgical

La perte des neurones dopaminergiques dans la maladie de Parkinson entraîne une hyperactivité des neurones glutamatergiques du noyau sous-thalamique [345,346]. Il a donc été suggéré que

l'inhibition de cette hyperactivité neuronale pouvait être un traitement efficace sur les symptômes de la maladie. La stimulation à haute fréquence de ces noyaux provoque un blocage de leur activité électrique diminuant ainsi les symptômes moteurs de la maladie [347,348]. Celle-ci s'effectue grâce à des électrodes implantées chirurgicalement dans les noyaux sous thalamiques et sont connectées à un stimulateur placé sous la clavicule permettant de régler l'intensité de cette stimulation. L'inhibition de l'hyperactivité du noyau sous-thalamique permet une levée du tonus inhibiteur exercé sur le thalamus provoquant ainsi une activation des aires motrices corticales à l'origine du mouvement.

3.5 Modèles animaux de maladie de parkinson

Afin de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie ainsi que ses traitements, l'utilisation de modèles animaux expérimentaux est nécessaire. Plusieurs types de modèles peuvent être ainsi générés pour répondre aux différentes questions posées sur la maladie.

3.5.1 Modèles neurotoxiques

Le but est d'induire une mort cellulaire sélective des neurones dopaminergiques via l'utilisation d'une substance chimique toxique injectée localement ou de manière systémique. Les 2 modèles les plus connus et utilisés sont les modèles 6-OHDA et MPTP.

3.5.1.1 Modèle 6-OHDA

La 6-hydroxydopamine (6-OHDA) est la forme hydroxylée de la dopamine (**Figure 33**). Elle agit comme une toxine provoquant la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée [349]. Elle a permis de développer un outil d'induction du Parkinson chez les rongeurs. Contrairement au MPTP (ci-dessous), le 6-OHDA ne traverse pas la BHE et requiert donc une injection intracérébrale dans le striatum ou sur les voies dopaminergiques [350]. C'est probablement l'un de ses points faibles car il nécessite un matériel chirurgical stéréotaxique particulier et un expérimentateur entraîné. Une lésion unilatérale du faisceau nigro-strié est généralement préférée car les lésions bilatérales entraînent le plus souvent une adipsie (absence de soif) et une aphagie rendant l'intubation gastrique pour alimentation indispensable chez les animaux traités [351]. Des lésions partielles bilatérales ont aussi été étudiées [352,353].

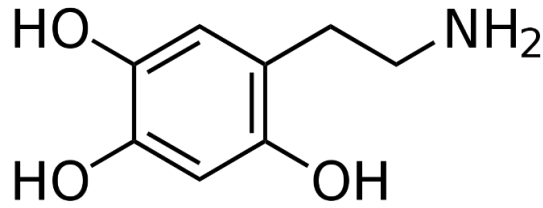


Figure 33 : Schématisation d'une molécule de 6-OHDA.

Après l'injection, la 6-OHDA est intégrée dans la cellule dopaminergique via le transporteur DAT. La structure de la 6-OHDA est spécifique des systèmes catécholaminergiques car très proche de la dopamine et la noradrénaline. Elle possède ainsi une haute affinité pour la DAT et pour le transporteur de la noradrénaline (NAT) [350,354]. Afin d'améliorer la spécificité de la toxine pour les neurones dopaminergiques, une injection systémique d'inhibiteur du NAT, la desipramine, est administrée 30-60 minutes avant l'injection du 6-OHDA [350]. Cette molécule est un inhibiteur de la recapture noradrénergique centrale et périphérique. Il semble que la toxicité du 6-OHDA soit la suivante : une fois incorporée dans le neurone, la 6-OHDA initie une dégénérescence via une combinaison de stress oxydatif et de dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale (**Figure 34**) [355–358]. Nombre de ces effets surviennent également dans le cerveau des patients atteints de la maladie de Parkinson, rendant ainsi ce modèle proche de la réalité [359]. Un autre degré de similitude tient au fait que le modèle 6-OHDA induit une réduction des concentrations de dopamine et de l'enzyme TH dans le striatum, de manière identique à ce qu'il est retrouvé chez les patients atteints de la maladie de Parkinson. Cependant, il n'induit pas les atteintes pathologiques concomitantes dans les autres régions cérébrales qui sont aussi altérées chez les patients malades. La dégénérescence du faisceau nigro-strié après l'injection de la molécule est proche de 90% [360]. Par contre, à l'inverse des lésions chroniques de la maladie, la dégénérescence neuronale débute dès 6h après l'injection et est maximale après 6 jours pour rester stable 4 semaines après la lésion [349,361,362]. Ainsi, le modèle est assez stable pour tester des agents pharmaceutiques agissant contre les symptômes de la maladie et notamment moteurs [363]. Les lésions dans la substance noire sont pratiquement totales et peuvent être comparées de manière controlatérale avec le côté non lésé. En revanche, c'est un mauvais modèle pour étudier les facteurs protecteurs ou les stratégies préventives. Le modèle 6-OHDA partage aussi les mêmes défauts que les autres modèles animaux de la maladie de Parkinson, à savoir qu'il n'aboutit pas à la formation de corps de Lewy qui sont pourtant le signe caractéristique de la maladie.

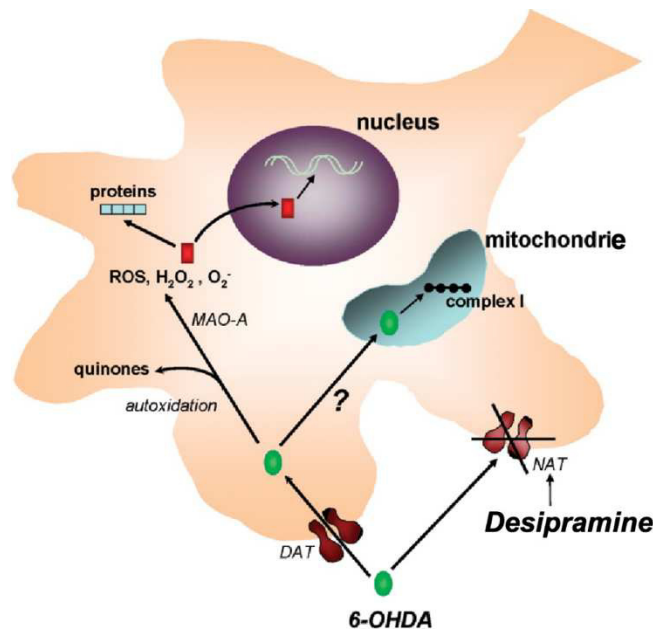


Figure 34 : Mécanisme d'action de la 6-OHDA. Le stress oxydatif faisant suite à l'intégration de la molécule dans la cellule via la DAT entraîne des altérations nucléaires ainsi qu'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (d'après Simola et al. [364]).

3.5.1.2 Intoxication au MPTP

Le MPTP est une toxine fréquemment utilisée pour induire un modèle de maladie de Parkinson chez les rongeurs et le primate. Il est basé sur son efficacité à provoquer des symptômes persistants de la maladie chez l'homme [365,366]. Les investigations anatomopathologiques ont montré une destruction spécifique des neurones dopaminergiques du faisceau nigro-strié chez les consommateurs de MPTP à visée récréative et chez des modèles primates [319,367,368]. Il faut tout de même noter que plusieurs espèces, dont le rat, sont insensibles à une intoxication au MPTP, possiblement liée à la clairance relativement rapide du MPP⁺, le métabolite toxique du MPTP dans l'organisme [369]. En effet, le rat possède de grandes quantités de MAO-B au niveau des vaisseaux périphériques dégradant rapidement la molécule avant son passage de la BHE. Cependant, certaines souches de souris, dont les C57BL/6 sont sensibles au MPTP [370] et ont permis de développer un modèle murin de maladie de Parkinson par intoxication au MPTP.

Le mécanisme derrière l'action neurotoxique du MPTP a été extensivement étudié et est relativement bien connu. Le MPTP est une protoxine lipophile qui, après une injection systémique, traverse rapidement la BHE [371]. Une fois dans le cerveau, le MPTP est converti par la MAO-B, qui se trouve dans la microglie et les neurones sérotoninergiques, en MPDP⁺

intermédiaire avant sa rapide oxydation spontanée en MPP^+ , le composé neurotoxique [372]. Après son relargage dans l'espace extracellulaire, le MPP^+ est introduit dans le cytoplasme du neurone dopaminergique par la DAT. Il va induire une série de processus pathologiques qui entraîne une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) qui vont contribuer à la neurotoxicité de la molécule [373]. La majorité du MPP^+ s'accumule dans les mitochondries où il va altérer la chaîne respiratoire mitochondriale via l'inhibition du complexe I de la chaîne de transport des électrons [374]. Cette action va empêcher le flux d'électrons le long de la chaîne respiratoire mitochondriale, amenant à réduire la production d'adénosine triphosphate (ATP) et provoquer la génération de ROS. Cet effet combiné d'une concentration basse d'ATP et de l'élévation de la production de ROS va initier des signaux amenant à l'apoptose cellulaire [375,376]. Le MPP^+ va aussi agir en se liant avec le VMAT2 et être séquestré dans les vésicules présynaptiques altérant ainsi leur fonctionnement (**Figure 35**) [377]. Enfin il peut interagir en altérant directement le fonctionnement des enzymes cytosoliques. L'ensemble de ces actions vont contribuer à une formation accrue de ROS [378]. De la même manière, l'ensemble de ces mécanismes oxydatifs intracellulaires sont aussi retrouvés en pathologie humaine des patients atteints de la maladie de Parkinson.

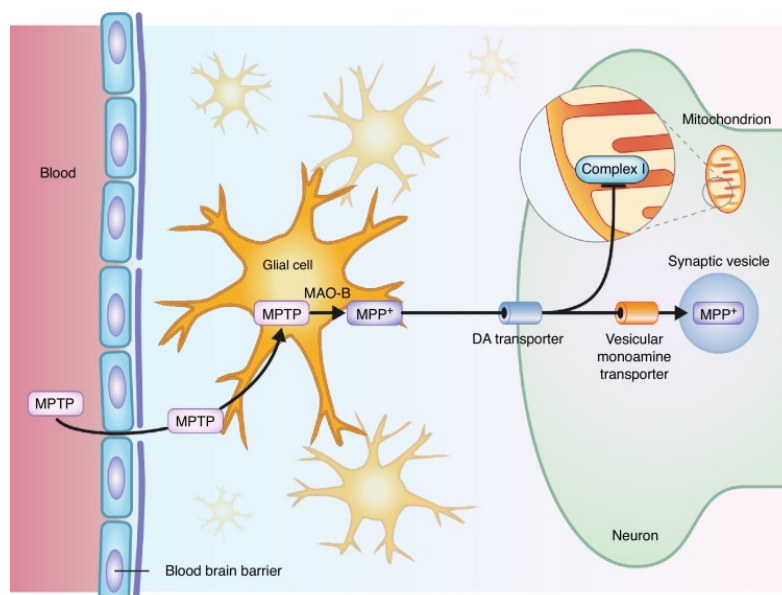


Figure 35 : Mécanisme d'action du MPTP. Après le passage de la barrière hémato-rétinienne externe, le MPTP est métabolisé en MPP^+ puis en MPP^+ , le composé toxique dans la cellule microgliale. Il va ensuite être intégré dans la cellule dopaminergique via son transporteur DAT. Dans la cellule, le MPP^+ va agir sur la chaîne respiratoire mitochondriale et va aussi être intégré dans les vésicules présynaptiques via le transporteur VMAT (d'après Philippens et al. [379]).

Le modèle de MPTP a des avantages par rapport au modèle 6-OHDA : en plus du gain économique, il ne nécessite pas un matériel et un expérimentateur spécialisé. De plus, étant injecté de manière systémique, la molécule va altérer le faisceau nigro-strié de manière bilatérale, reflétant plus fidèlement les lésions retrouvées dans la maladie de Parkinson. Cependant, certains désavantages existent, particulièrement en lien avec la reproductibilité des lésions (**Tableau 4**). En effet, les souris sont moins sensibles au MPTP que les primates et de plus hautes doses sont nécessaires pour réaliser les lésions. Ces doses élevées peuvent être létales et entraîner des neuro- ou cardio-toxicités périphériques [380]. Afin de réduire au maximum ces effets secondaires, les doses sont fractionnées, réduisant ainsi la létalité à moins de 20% [380]. L'intoxication peut aussi se dérouler sur plusieurs jours afin de diluer ces effets. L'autre précaution à prendre est pour l'expérimentateur. L'homme étant très sensible au MPTP, sa manipulation, ainsi que celle des animaux doit être très réglementée et protégée [380].

Concernant la variabilité de l'atteinte, plusieurs facteurs sont connus pour influencer la reproductibilité de la lésion. L'âge, le sexe et le poids sont les exemples les plus courants en plus des conditions de l'animalerie et de la lignée de souris utilisée [381]. Plusieurs régimes de traitements ont été testés et sont validés pour induire des lésions proches de la maladie de Parkinson chez les souris intoxiquées par le MPTP.

Les modèles aigus consistent à injecter 1 à 4 doses dans la journée aux souris, pouvant entraîner la perte de 60 à 90% des neurones dopaminergiques striataux, même s'il peut y avoir une tendance à la récupération de ces neurones avec le temps [382]. Les modèles plus chroniques consistent à injecter la neurotoxine à des intervalles plus longs, de quelques jours à plusieurs semaines. Ils permettraient, au prix d'une expérimentation plus longue, d'atteindre un taux de perte neuronale dopaminergique d'environ 80-90% [383]. Comme noté pour le 6-OHDA, ce modèle induit une mort rapide des neurones dopaminergiques ne traduisant pas la réalité de l'atteinte clinique. Par ailleurs, il existe des discordances dans les études sur la présence de corps de Lewy intracellulaires, certaines les retrouvant [384] et d'autres non [385,386].

Les souris intoxiquées au MPTP montrent des signes cliniques d'akinesie et de catalepsie qui peuvent s'apparenter au symptôme de la maladie de Parkinson [387]. Ces effets cliniques sont dépendants du mode d'intoxication et restent généralement légers. Les souris ayant reçu une intoxication aiguë ressentent ces symptômes dans les 2-3 jours suivant l'injection [388] mais ils disparaissent rapidement, faisant ainsi de ce mode d'intoxication un mauvais modèle pour étudier les effets moteurs de la maladie. Les modèles d'intoxications plus chroniques permettraient d'étudier ces symptômes plusieurs semaines après l'intoxication [383,389,390].

De plus, la toxine étant injectée de manière systémique, elle va induire des lésions bilatérales, ne permettant pas la comparaison chez le même animal d'un côté lésé et de l'autre sain. Ainsi, selon le modèle souhaité et l'hypothèse étudiée, le mode d'intoxication sera différent.

Le modèle de souris MPTP est classiquement utilisé pour étudier les modifications biochimiques et moléculaires des événements impliqués dans la maladie. Il a permis entre autres de mettre en évidence l'importance de la perturbation énergétique [391], l'implication des dérivés réactifs à l'oxygène [392] et l'activation des voies de l'apoptose [393] dans la maladie de Parkinson.

Tableau 4 : Comparaison des modes d'intoxication au 6-OHDA et MPTP.

	Avantages	Inconvénients
6-OHDA	Lésions profondes du striatum Atteintes motrices	Unilatéral seulement Non adapté aux souris Difficulté technique
MPTP	Lésions bilatérales Adapté aux souris	Variabilité des atteintes Létalité proche de 20% Peu d'atteintes motrices Risque pour l'opérateur

3.5.1.3 Intoxication aux pesticides

D'autres modèles d'intoxications utilisant des pesticides ont été testés avec des résultats différents selon les molécules ou les études. Ainsi la Roténone, le Paraquat et le Maneb ont été essayés avec des résultats variables. Cependant, cette variabilité des lésions induites et les effets secondaires systémiques de ces molécules n'en font pas des toxines de choix dans la validation de ces modèles de maladie de Parkinson [394].

3.5.2 Autres modèles

3.5.2.1 Transgénique

Il s'agit de modèles développés chez la souris ou la drosophile par *knock-out* ou par surexpression de certains gènes associés à la maladie (α -synucléine, parkine,...) [395–397]. Par

exemple la surexpression de l' α -synucléine provoque des inclusions identiques aux corps de Lewy dans le cerveau mais peu de pertes neuronales et de déficits moteurs [395,397,398].

3.5.2.2 Transfection virale

Il s'agit de surexprimer l' α -synucléine à l'aide d'adénovirus ou de lentivirus. Ces animaux transfectés montrent une perte neuronale significative des neurones dopaminergiques dans la pars compacta de la substance noire et d'inclusions cytoplasmiques ressemblant aux corps de Lewy [399].

3.5.2.3 Pharmacologiques

L'utilisation de composés pharmacologiques, tels que des antagonistes à large spectre, permet d'induire un blocage transitoire de la transmission dopaminergique entraînant un syndrome parkinsonien sévère mais transitoire. Ainsi les modèles à la reserpine puis à l'haloperidol ont permis d'étudier certains agents pharmacologiques dopaminergiques [394].

PARTIE C- LIEN ENTRE MALADIE DE PARKINSON ET DMLA

I- MALADIE DE PARKINSON ET ALTERATION RETINIENNE

La maladie de Parkinson peut engendrer de nombreux troubles oculaires qu'ils soient liés à la motricité ou à la sensorialité visuelle [310,312]. Ces anomalies peuvent être attribuées d'une part à des déficits corticaux et sous corticaux sur les voies visuelles [400], mais aussi à des anomalies rétinienne locales, ce que confortent les résultats de tests électrophysiologiques et d'analyses structurales en imagerie. En effet, la rétine contient des cellules produisant de la dopamine, apparentées aux cellules amacrines au sein de la couche nucléaire interne et de la plexiforme interne. Quelques publications ont montré la diminution de l'expression de l'enzyme TH, caractéristique des cellules produisant de la dopamine, dans la rétine de patients atteints de la maladie de Parkinson [401] et d'animaux [402–404]. Pourtant une seule publication a montré la diminution de la concentration rétinienne en dopamine chez des patients atteints par la maladie de Parkinson [405].

1.1 Modification de l'activité électrique rétinienne

L'ERG rétinien a permis de mettre en évidence des modifications des réponses électriques rétiniennes chez les patients atteints de la maladie de Parkinson. D'un côté, il a été observé une diminution de l'amplitude de l'onde b en condition photopique ainsi que des potentiels oscillatoires [406–408] : ces observations impliquent le fonctionnement des interneurons rétiniens qui comprennent, entre autres, les cellules amacrines dopaminergiques. D'un autre côté, une diminution de l'amplitude et une latence augmentée de l'onde P50 du pattern ERG ont été retrouvées chez les patients malades. Ces anomalies peuvent faire évoquer une altération des cellules ganglionnaires rétiniennes, et sembleraient être corrélées à une communication intercellulaire défailante de la dopamine [406,409,410].

1.2 Modification de l'architecture rétinienne in vivo

De nombreuses études se sont donc attachées à évaluer l'architecture rétinienne chez les patients atteints de la maladie de Parkinson en comparaison avec des cohortes de patients sains.

Ces analyses ont grandement été facilitées par l'avènement de l'imagerie multimodale et notamment par le développement de l'OCT qui permet une analyse quasi histologique des couches rétinienne. Ainsi des fines altérations peuvent être mises en évidence et peuvent être localisées sur les différentes strates cellulaires rétinienne (**Figure 36**).

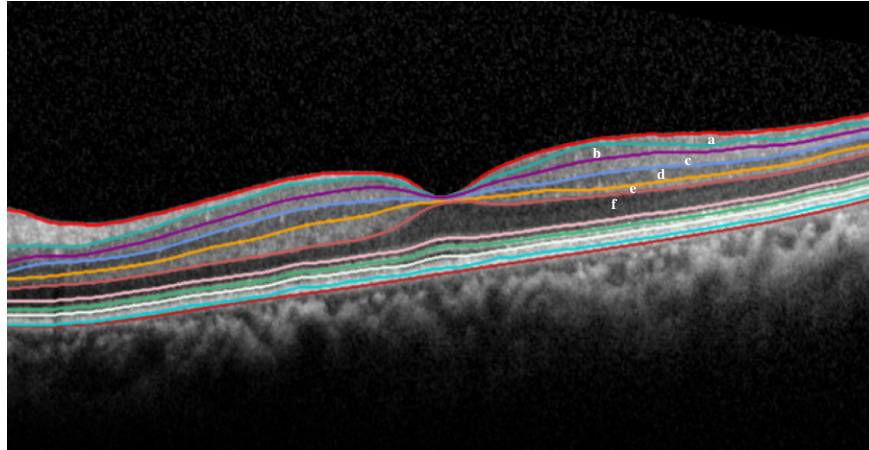


Figure 36 : Segmentation des couches rétinienne sur l'OCT. a. Couche des fibres optiques; b. Couche des cellules ganglionnaires; c. Couche plexiforme interne; d. Couche nucléaire interne; e. Couche plexiforme externe; f. Couche nucléaire externe (d'après Chorosteski et al. [411]).

Une tendance à l'amincissement rétinien a été retrouvée associée à la maladie de Parkinson dans les premières études utilisant la technologie Time-domain [412]. Celle-ci serait plus importante au niveau fovéolaire [413]. Le développement de la technologie Spectral-domain en OCT a permis de localiser plus précisément les couches atteintes par ce rétrécissement et il semblerait que les couches internes de la rétine soient les plus affectées par ces modifications [414,415]. Il a ainsi été retrouvé une diminution des couches des fibres optiques, des cellules ganglionnaires, de la plexiforme interne et de la plexiforme externe chez les patients atteints de la maladie de Parkinson [416–419]. Si cet amincissement semble corrélé avec l'ancienneté de la maladie [419] il serait présent dès les stades précoces chez les patients naïfs de tout traitement [420]. Il a été démontré que ces atteintes étaient évolutives sur une période d'évaluation de 5 ans [421]. Ensemble, ces données suggèrent une perte des cellules ganglionnaires : couche des cellules ganglionnaires, de la plexiforme interne, de la nucléaire interne, ainsi qu'une éventuelle diminution du nombre de cellules dopaminergiques dans la zone de cellules amacrines (couche plexiforme interne et couche nucléaire interne). Ces hypothèses anatomiques sont corroborées par les études fonctionnelles utilisant l'ERG décrites plus haut. Celles-ci montrent des

altérations du fonctionnement des interneurons rétiniens, dont font partie les cellules amacrines dopaminergiques [406–408]. Par ailleurs, les couches externes de la rétine, contenant les photorécepteurs, n'ont pas été retrouvées modifiées chez les patients malades.

Plusieurs hypothèses ont été soulevées pour expliquer la perte en cellules ganglionnaires :

- La neurodégénérescence primitive des cellules ganglionnaires et de leurs axones va entraîner un amincissement mécanique des couches les plus internes de la rétine
- Une dégénérescence transsynaptique rétrograde depuis les voies visuelles postérieures peut aussi être évoquée et a déjà bien été montrée dans d'autres études évaluant des pathologies cérébrales diverses [422].

Sur la base de ces données, plusieurs auteurs ont donc suggéré d'utiliser l'OCT comme un biomarqueur précoce de la maladie et qui pourrait être utilisé à visée diagnostic. En effet, de nombreuses preuves cliniques, neuropathologiques et d'imagerie suggèrent que le début de la maladie commence bien avant les signes cardinaux moteurs caractéristiques de l'atteinte cérébrale [423]. La connaissance de cette phase prodromale de la maladie de Parkinson est particulièrement intéressante pour le développement de nouvelles stratégies diagnostics pouvant laisser ensuite la place à une intervention thérapeutique plus précoce, avant l'apparition de l'atteinte irréversible [423,424].

Cependant, il s'avère que d'autres pathologies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, semblent donner des atteintes similaires au niveau de la rétine [425,426]. D'autres études plus précises sur les différences qui existent entre ces 2 maladies, ainsi que sur d'autres atteintes neurodégénératives, sont nécessaires afin de mieux affiner le rôle de l'OCT dans ces pathologies.

1.3 Présence d' α -synucléine dans la rétine

La maladie de Parkinson est une α -synucléopathie se traduisant par l'accumulation de ces agrégats protéiques dans les cellules amenant à la neurodégénérescence. Plusieurs études se sont donc attachées à rechercher ces agrégats d' α -synucléine dans la rétine humaine et animale (**Figure 37**) [427–430].

L' α -synucléine a été retrouvée dans les rétines de patients sains, localisée dans les couches nucléaire interne, plexiforme interne et dans la couche des cellules ganglionnaire [431,432]. De plus, cette protéine a aussi été retrouvée dans les photorécepteurs au niveau de leur partie externe [432]. Ces observations chez ces patients sains sont probablement en lien avec la présence d' α -synucléine dans sa forme monomérique, qui est principalement localisée dans le cytoplasme des terminaisons nerveuses pré-synaptiques des neurones dopaminergiques et non dopaminergiques. Sa fonction restant encore imparfaitement connue, il semblerait qu'elle soit associée à la plasticité synaptique et au trafic des vésicules contenant les neurotransmetteurs [433].

Dans les rétines de patients atteints de la maladie de Parkinson, l' α -synucléine a été retrouvée accumulée en agrégats insolubles, et anormalement phosphorylée au niveau de la couche nucléaire interne, de la plexiforme interne et de la couche des cellules ganglionnaires. Cette accumulation a été mise en évidence au niveau de la macula mais aussi de la rétine périphérique [427–429]. Des amas organisés d' α -synucléine ressemblant à des corps de Lewy ont eux aussi été retrouvés dans la couche nucléaire interne et dans la couche des cellules ganglionnaires. Cependant une autre étude n'a pas retrouvé d'accumulation dans la rétine de patients atteints de la maladie de Parkinson [430]. Ces résultats contradictoires peuvent être expliqués par le faible nombre d'œil inclus dans chaque étude, dans les différences de traitements immunohistochimiques des rétines, ainsi que par la nature de l'anticorps utilisé et de sa cible.

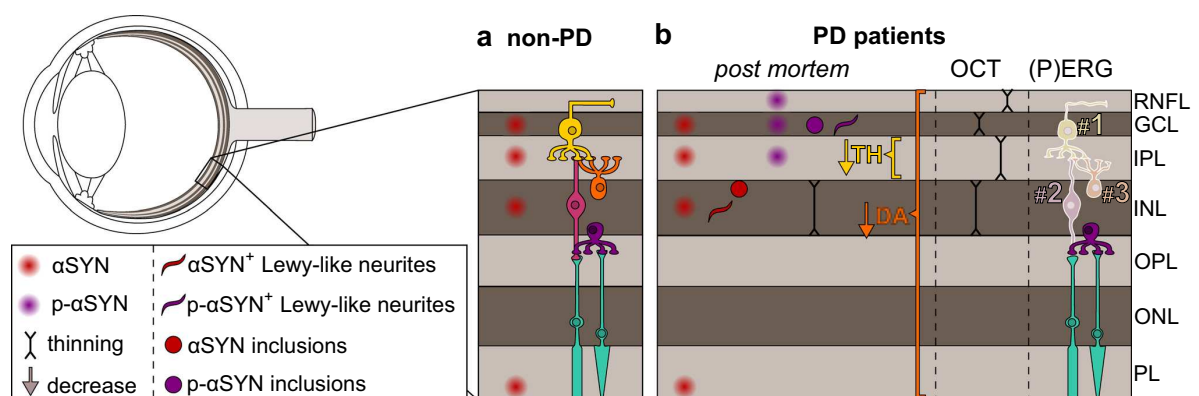


Figure 37 : Schématisation des modifications rétiniennees associées à la maladie de Parkinson. Les études sur l'ERG ont retrouvé #1 une réduction d'amplitude et un allongement de la latence de l'onde P50 qui est un indicateur d'altération des cellules ganglionnaires ; #2 une diminution de l'amplitude de l'onde b en condition photopique indiquant une probable dysfonction des cellules bipolaires ; #3 une diminution en condition scotopique des potentiels oscillatoires indiquant une activité défaillante des cellules amacrine (d'après Veys et al. [434]).

II- MALADIE DE PARKINSON ET INFLAMMATION

Comme défini plus haut, la DMLA pourrait être en lien avec la rupture du privilège immunitaire, amenant ainsi à une accumulation de cellules immunitaires dans l'espace sous rétinien [79,435]. Il peut en être de même dans la maladie de Parkinson où la neurodégénérescence pourrait être provoquée, ou accentuée par la neuro-inflammation. En effet, le système nerveux central est considéré, tout comme l'œil, comme un espace de privilège immunitaire. Ce sanctuaire immunitaire est lié à l'absence de cellules dendritiques et immunitaires, un microenvironnement immunosuppresseur, et la présence d'une BHE qui sépare le parenchyme cérébral du système immunitaire périphérique [436]. Malgré ces différents niveaux de protection, le système nerveux central peut apporter une réponse immunitaire à l'encontre de dommages tels que des agents pathogènes ou des signaux endogènes. Cette réponse est initiée par la microglie, le macrophage tissulaire résident du système nerveux central qui peut être activé par différents stimuli [437]. Cette réaction inflammatoire a pour but de maintenir la structure tissulaire et son homéostasie, incluant l'élimination d'agents pathogènes, de cellules apoptotiques ou de débris tissulaires. Si le stimulus persiste, une réponse inflammatoire inadéquate, chronique s'installe [438]. De plus, cette inflammation peut aussi survenir suite à la sécrétion de molécules pro-inflammatoires par des neurones dégénérants. Cet état physiologique se nomme neuro-inflammation et il apparaît incertain que cette neuro-inflammation soit la cause ou la conséquence des maladies neurodégénératives [439].

Dans la maladie de Parkinson, comme dans les autres maladies neurodégénératives, il existe une dysfonction puis une perte de neurones spécifiques d'une région cérébrale. Cette dégénérescence peut être liée à plusieurs causes telles que l'accumulation de protéines anormales, la formation d'espèces réactives à l'oxygène causant un stress oxydatif, ou encore une neuro-inflammation [440]. Des études expérimentales sur modèles animaux ont montré que la neuro-inflammation pouvait jouer un rôle clé dans la progression d'une maladie de Parkinson [441]. En effet, un lien pourrait exister entre la neuro-inflammation et d'autres mécanismes pathogéniques décrits dans la maladie tels qu'une dysfonction mitochondriale, un stress oxydatif ou encore sur l'accumulation d' α -synucléine dans les neurones [442–444]. Ainsi, il s'avèrerait que le privilège immunitaire du système nerveux central soit compromis dans la maladie de Parkinson, autorisant ainsi le recrutement de cellules du système immunitaire périphérique [436]. Le rôle de ce système immunitaire semble en tout cas critique dans la progression de la maladie [445]. Il apparaît assez clairement que les cellules microgliales et les astrocytes

cérébraux jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cérébrale. Cependant, ce rôle neuroprotecteur peut être perdu sous certaines conditions d'altérations cérébrales aboutissant à un état neuro-inflammatoire [446,447].

III- LA DOPAMINE : LIEN ENTRE PARKINSON ET DMLA ?

2.1 Dopamine et angiogenèse

La dopamine a montré son efficacité à réduire la prolifération de nombreux types de tumeurs malignes chez la souris. Cette activité a été initialement attribuée à l'inhibition de la prolifération cellulaire cancéreuse et à la stimulation de l'immunité contre la lésion tumorale [448–452]. Cependant, certaines études dans les années 1990 ont démontré la présence de récepteurs à la dopamine sur les cellules endothéliales de la circulation générale, mais aussi de la microvascularisation cérébrale [453,454]. Suite à cette découverte, Basu *et al.* ont ainsi investigué le rôle de la dopamine sur l'angiogenèse comme action anti-tumorale et notamment son action sur le VEGF. A l'aide de cultures d'HUVEC, et d'agonistes/antagonistes des différents récepteurs dopaminergiques, les auteurs ont montré une action anti-angiogénique de la dopamine via son récepteur D2. En effet, la prolifération des HUVEC et leur migration sont inhibés par des agonistes D2 et augmentés par des antagonistes D2 en présence de dopamine [455]. De manière plus spécifique, il semblerait que l'action anti-angiogénique soit liée à la diminution de la phosphorylation du VEGFR-2, altérant ainsi la signalisation pro-angiogénique sous-jacente à ce récepteur. D'autres voies intracellulaires ont aussi été retrouvées altérées par l'action de la dopamine [456,457] telle que la diminution de la phosphorylation de la focal adhesion kinase (FAK, enzyme augmentant la perméabilité vasculaire [458]) et de la Mitogene-activated protein kinase (MAPK, enzyme stimulant la prolifération cellulaire [459]). *In vitro*, il a été observé une quasi co-localisation du récepteur D2 et du VEGFR-2 pouvant expliquer leurs interactions.

Suite à la mise en évidence du lien entre le récepteur D2 et le VEGFR-2, plusieurs études ont confirmé l'action anti-angiogénique de la dopamine sur les cancers solides, l'angiogenèse étant l'un des éléments principaux de la croissance tumorale [460]. D'une part, les analyses immunohistochimiques n'ont pas retrouvé de cellules exprimant l'enzyme TH dans les tumeurs malignes [461], rendant improbable la sécrétion de dopamine au sein de ces lésions. D'autre part, la concentration en dopamine dans ces tumeurs a été retrouvée significativement réduite par rapport à des tissus de patients sains [462]. Ces données suggèrent que la régulation de l'angiogenèse peut être présente dans des tissus normaux mais peut aussi être réduite dans certains types de tumeurs. De plus, l'ablation des nerfs dopaminergiques périphériques, proches du réseau vasculaire [463], semble entraîner une augmentation de la perméabilité vasculaire, de

la densité microvasculaire et de l'angiogenèse périphérique, aboutissant au développement de tumeurs sur des modèles de souris pro-tumorales [464]. L'ensemble de ces résultats est donc en faveur d'un rôle anti-angiogénique de la dopamine dans l'évolution tumorale. Ainsi, l'action de la dopamine comme agent anti-cancéreux a été investiguée avec succès dans des études pré-cliniques portant sur différentes formes de cancer : gastro-intestinal [457,465], pulmonaire [466], ou du sein [457]. Elle a aussi montré son efficacité en association synergique avec d'autres molécules anticancéreuses [457,467].

2.2 Dopamine et inflammation

La dopamine pourrait jouer un rôle de régulation du système immunitaire, et selon les conditions être pro- ou anti-inflammatoire.

2.2.1 Modulation de l'homéostasie immunitaire par la dopamine

Au-delà du rôle de transduction d'un signal nerveux, les neurotransmetteurs ont montré un rôle sur la régulation du système immunitaire [468]. Parmi ceux-ci la dopamine a elle aussi montré une action de modulation sur la réaction immunitaire [452,469,470]. La dopamine est synthétisée par différentes cellules immunitaires, et de nombreux récepteurs ont été retrouvés présents sur ces cellules [452,471,472]. Ainsi, la présence des récepteurs D1 à D5 a été montrée à la surface des lymphocytes B et T, Mos, neutrophiles, cellules dendritiques, éosinophiles et cellules NK [471–473].

De plus, certaines cellules immunitaires contiennent de la dopamine [474], permettant de réguler les fonctions du système immunitaire périphérique via une boucle autocrine/paracrine [469]. Elle permettrait par exemple d'orienter une différenciation des cellules lymphocytaires T en lignée Th1 en réponse à d'autres médiateurs immunitaires [473].

Il a aussi été mis en évidence des boucles d'autorégulation agissant via des récepteurs D1 à la surface des cellules dendritiques permettant d'autocontrôler la synthèse et la sécrétion de dopamine par ces mêmes cellules [473].

Par ailleurs, la stimulation de récepteurs dopaminergiques de type D2 et D3 sur une population de lymphocytes T en repos permettrait d'activer un système d'intégrines sur ces cellules. Cette action, à la base du trafic et de l'extravasation des cellules T au travers des vaisseaux sanguins et

des barrières tissulaires, pourrait expliquer la présence de cellules inflammatoires dans des zones dites de privilège immun [208,475]. Enfin, la stimulation par la dopamine de ces mêmes cellules T en repos entraînerait une augmentation de l'activité sécrétoire en cytokine via l'activation de différents récepteurs à la dopamine à sa surface [476].

De manière concomitante, il semblerait que la dopamine agisse aussi sur les lymphocytes T activés entraînant une inhibition de leur prolifération, et de la sécrétion de cytokines [477]. Il a aussi été montré que la stimulation du récepteur D4 à la surface de ces cellules activées entraînerait un état de quiescence cellulaire [478].

Ces différentes actions sur ces cellules, en repos ou activées, sont en faveur d'un rôle de modulation de la réaction immunitaire par la dopamine [452]. Ainsi, la modification des concentrations en dopamine dans un tissu pourrait modifier l'homéostasie immunitaire locale (**Figure 38**). Certaines études se sont donc intéressées à ces modifications immunitaires induites par le changement de concentration en dopamine dans l'étiopathogénie des maladies de Parkinson et de la schizophrénie [479,480].

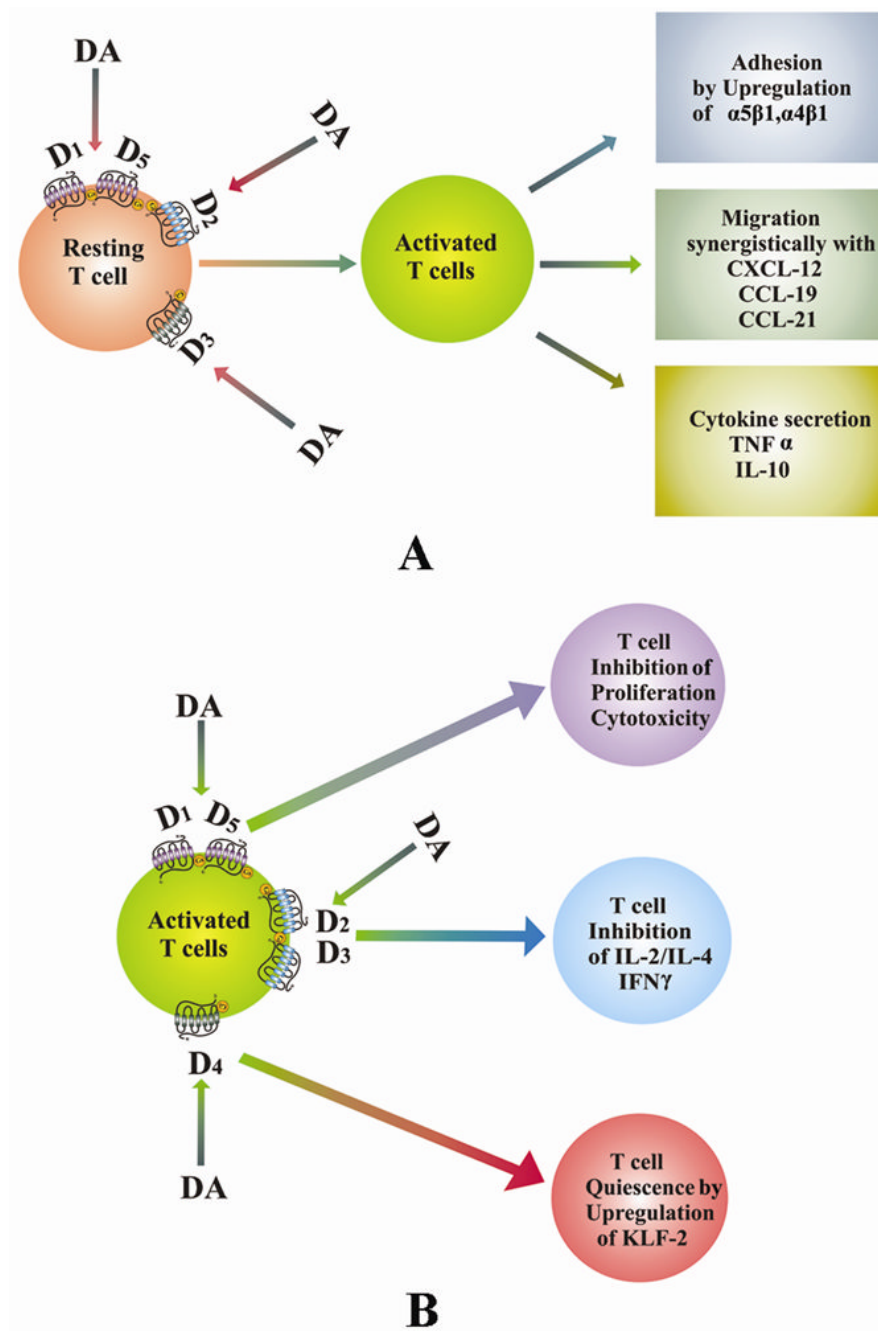


Figure 38 : Schématisation de l'action de la dopamine sur des cellules lymphocytaires T en repos ou activés. DA: dopamine (d'après Sarkar et al. [469]).

IV- ÉTUDES EPIDEMIOLOGIQUES : Parkinson – DMLA – Dopamine

Récemment, de nombreuses études épidémiologiques de grande envergure ont été réalisées grâce à l'analyse de données informatisées provenant de diverses sources : données d'assurance maladie, de mutuelles, ou encore données hospitalières. Ces analyses, dites sur base de données (*Big data*) permettent de mettre en évidence des liens sur un grand nombre de patients, là où des études prospectives plus classiques seraient irréalisables.

4.1 Lien entre maladie de Parkinson et la DMLA

Plusieurs études épidémiologiques ont récemment montré que les patients traités pour une DMLA, et notamment dans sa forme néovasculaire, avaient une incidence augmentée de développer une maladie de Parkinson [481–483].

Ainsi Chung *et al.* ont montré une augmentation du risque ($HR=2,57$) de développer une maladie de Parkinson dans les 3 ans suivant le diagnostic d'une DMLA exsudative [481]. De la même manière, Etminan *et al.* ont eux aussi retrouvé une incidence augmentée de la maladie de Parkinson ($HR=2,03$) après le traitement d'une DMLA exsudative [483]. Enfin, dans une autre étude épidémiologique portant sur plusieurs maladies dégénératives, Choi *et al.* ont retrouvé un risque augmenté à ($HR=1,46$) d'avoir une maladie de Parkinson associée à une DMLA [482].

Ces liens retrouvés entre la DMLA et la maladie de Parkinson pourraient être liés aux injections répétées d'anti-VEGF, mais aussi et surtout à des facteurs de risques communs. Au-delà de l'âge moyen avancé de la population atteinte par ces affections neurodégénératives, ces 2 maladies sont aussi associées à des facteurs de risques cardio-vasculaires communs tels que l'hypertension artérielle, le diabète et l'hyperlipidémie [484–487]. D'autre part, ce lien pourrait être expliqué par des polymorphismes génétiques à risques communs, comme des variants de l'apolipoprotéine [488,489].

A noter que le tabagisme, qui est l'un des facteurs de risques les plus importants dans la DMLA, est un facteur reconnu comme protecteur dans la maladie de Parkinson [490]. Cependant, cet effet protecteur a été récemment remis en question en raison d'une probable stimulation moindre du circuit de la récompense par la nicotine chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, les rendant moins enclins à être attirés par le tabac [491].

Les phénomènes dégénératifs qui sous-tendent la DMLA et la maladie de Parkinson peuvent aussi être analysés de manière similaire comme une anomalie du système autophagique. L'accumulation de dépôts de lipofuscine dans l'EPR de patients atteints de DMLA, et la présence dans les neurones d' α -synucléine pour les patients présentant la maladie de Parkinson, contribuent toutes deux à la mort cellulaire car elles ne peuvent pas être recyclées dans la cellule.

4.2 Lien entre L-DOPA et DMLA

Une récente étude rétrospective a retrouvé dans une large population de patients une action protectrice de la L-DOPA sur le développement de la DMLA et en particulier la DMLA néovasculaire [492]. En détail, Brilliant *et al.* ont montré que l'âge de diagnostic de DMLA était en moyenne réalisé 8 ans plus tard chez des patients ayant eu une prescription de L-DOPA en comparaison avec des patients non traités (79,3 ans versus 71,3 ans respectivement). Une sous-analyse de cohorte a aussi retrouvé un âge plus avancé de diagnostic de DMLA néovasculaire chez les patients traités par rapport aux non traités (80,8 ans versus 75,8 ans respectivement). Dans une autre étude expérimentale, les auteurs ont émis l'hypothèse que la L-DOPA agirait sur un récepteur orphelin, le GPR 143 [493,494] situé sur l'EPR. Ils ont ainsi montré que la stimulation de ce récepteur par la L-DOPA aurait pour effet d'augmenter la sécrétion de PEDF à la face apicale de l'EPR et de diminuer la sécrétion de VEGF à sa partie basale, expliquant ainsi l'effet protecteur de cette molécule [495,496].

4.3 Biais des études épidémiologiques

Bien que les études sur base de données permettent d'inclure un nombre important de patients, de nombreux biais sont à prendre en compte.

Premièrement, les diagnostics de maladie de Parkinson et de DMLA sont cliniques avec des critères non stricts. Il peut donc y avoir un nombre de cas pour lesquels le diagnostic est incertain voire même erroné, au contraire d'études randomisées où les critères d'inclusion et d'exclusion sont plus précis et laissent peu de place à l'hésitation diagnostic.

Deuxièmement, le renseignement du diagnostic est le plus souvent réalisé par la cotation administrative de la maladie ou la prescription d'un traitement spécifique. Il convient ainsi de trouver la bonne stratégie pour accéder à la population cible. La recherche d'une maladie peut

être réalisée par la requête d'un codage spécifique de cette entité, ou par la prescription d'un traitement spécifique de l'affection. Par exemple la DMLA néovasculaire peut être mise en évidence soit par un codage spécifique à ce sous type de maladie s'il a été renseigné dans la base de données, soit par la recherche d'un traitement anti-VEGF par injection intravitréenne chez le patient. Dans ces 2 cas, des biais peuvent exister par la non-spécificité des requêtes sur la base de données.

Troisièmement, de nombreux facteurs confondants sont à prendre en compte dans l'analyse afin de ne pas méconnaître un lien potentiel entre l'un de ces facteurs et l'effet étudié. Par exemple, un traitement par L-DOPA est constamment administré en association avec un inhibiteur de la DDC périphérique, qui peut augmenter la concentration en dopamine périphérique [497]. De plus, la grande majorité des patients traités par L-DOPA présentent aussi une maladie de Parkinson associée. Ainsi chacun de ces facteurs associés à la prise de L-DOPA peut être responsable d'un potentiel effet visualisé sur l'incidence de la DMLA [492].

Ainsi les données des études sur base de données devraient toujours être interprétées avec prudence [498]. En effet, une association n'indique pas forcément une relation de cause à effet, et même si de nombreux facteurs confondants sont ajustés dans l'analyse, d'autres facteurs non contrôlés ou étudiés peuvent aussi être associés.

C'est pour ces raisons que les études sur bases de données doivent être vérifiées par des études prospectives ainsi que par des études plus fondamentales recherchant et expliquant la physiopathologie de la relation étudiée.

OBJECTIFS

Des études épidémiologiques ont récemment montré un lien entre la DMLA exsudative et la maladie de Parkinson [481–483,492]. Ce lien pourrait être lié aux maladies elles-mêmes, à leurs thérapeutiques, mais aussi à des facteurs de risques communs, tels que certains variants génétiques et des mécanismes neurodégénératifs communs [488,489]. De plus, la physiopathogénie de ces maladies est proche avec la perte de l'état de privilège immun du tissu et le recrutement de cellules immunitaires dont des Mos circulants [79,499,500]. Ces derniers, notamment lors de leur activation, peuvent entraîner des dégâts tissulaires à la base des lésions cliniques caractéristiques à ces 2 maladies [58].

En raison du design des études épidémiologiques, il apparaît impossible de différencier ces liens. Par exemple, un patient atteint de la maladie de Parkinson est presque systématiquement traité par la L-DOPA (parfois par des agonistes dopaminergiques), et ce traitement est constamment prescrit en association avec une molécule inhibant la DDC périphérique [344]. Ainsi, un éventuel lien entre la DMLA et la maladie de Parkinson pourrait être lié à chacun de ces facteurs.

L'objectif de cette thèse est d'explorer les mécanismes physiopathologiques d'un possible lien entre maladie de Parkinson et la DMLA :

- La voie inflammatoire par perte du privilège immun semble être associée à la DMLA et à la maladie de Parkinson dès les stades les plus précoces et il pourrait y avoir des mécanismes intriqués entre ces 2 pathologies et leurs traitements.
- L'angiogenèse, liée au stade tardif de la DMLA, qui représente la croissance sous la rétine de membrane néovasculaire, pourrait être modulée par des modifications des taux de dopamine.

Afin de répondre à ces questions, nous explorerons d'une part les interactions sur l'inflammation sous-rétinienne, précurseur de la DMLA, engendrées par la maladie de Parkinson mais aussi par la L-DOPA. Nous étudierons d'autre part l'effet de la maladie de Parkinson et de la L-DOPA sur l'angiogenèse choroïdienne, caractéristique du stade tardif exsudatif de la DMLA.

Avec comme objectif une investigation globale, nous avons développé des modèles biologiques cellulaires nouveaux, expérimenté nos hypothèses sur des modèles animaux et confronté nos résultats aux études épidémiologiques sur bases de données.

PARTIE

EXPERIMENTALE

I- INTRODUCTION ET PLAN EXPÉRIMENTAL D'ENSEMBLE.

Comme le suggère l'analyse de la littérature scientifique que nous venons de présenter, certains processus biologiques semblent lier la DMLA et la maladie de Parkinson. Dans notre travail de thèse, nous nous sommes attachés à explorer les deux voies majeures évoquées dans les publications :

- La voie inflammatoire par perte du privilège immunitaire qui semble être associée à la DMLA et à la maladie de Parkinson dès les stades les plus précoces.
- L'angiogenèse liée au stade tardif de la DMLA et qui représente la croissance sous la rétine de membrane néovasculaire pouvant altérer les couches rétinienne.

Dans un premier temps, afin d'analyser l'influence de la dopamine et de la L-DOPA sur l'inflammation rétinienne présente dans le cadre d'une DMLA, nous avons validé un modèle de co-culture associant de l'EPR de porc avec des Mos humains. Ce modèle permet ainsi d'étudier les interactions d'un type cellulaire sur l'autre, dans un espace où normalement aucune cellule immunitaire n'est présente. Nos résultats reproduisent bien ce qui est visualisé physiologiquement, c'est-à-dire une disparition des Mos au contact de l'EPR. Cette clairance est diminuée dans le cas d'une activation de ces Mos. La survie accrue de ces cellules immunitaires sur l'EPR induit des altérations de fonctionnement de ce tissu via une sécrétion accrue de cytokines et notamment du $\text{TNF}\alpha$ (**Article 1**, [58], **Article 2**, [59]).

Après la validation de ce modèle de co-culture, nous avons introduit de la dopamine ou de la L-DOPA sur nos cultures, selon différentes conditions. Aucune différence significative n'a été mise en évidence après l'ajout de ce neurotransmetteur indiquant qu'un rôle direct sur l'EPR ou les Mos est peu probable dans les mécanismes de régulation et de clairance des cellules inflammatoires rétinienne.

Afin d'éliminer un rôle clé de la L-DOPA sur le recrutement de cellules inflammatoires dans la rétine, une expérimentation *in vivo* d'illumination rétinienne n'a pas montré de différence sur le nombre de ces cellules dans l'espace sous rétinien des souris illuminées. L'ensemble de ces données ne sont pas en faveur d'une dérégulation immunitaire médiée par la L-DOPA dans le développement d'une DMLA.

Dans un deuxième temps, nous avons investigué séparément le rôle de la maladie de Parkinson, et celui de son traitement sur l'angiogenèse survenant dans le cadre d'une DMLA exsudative. L'analyse d'une base de données a révélé que les patients chez qui la L-DOPA était prescrite étaient protégés contre une DMLA, et en particulier une DMLA exsudative [492]. Les auteurs avaient antérieurement montré que la L-DOPA inhibait la sécrétion de VEGF dans des monocultures d'EPR via le récepteur orphelin GPR143 [493,494] et ils ont alors proposé qu'un mécanisme similaire pouvait être responsable de cette observation épidémiologique. Cependant, le traitement par L-DOPA est invariablement administré avec un inhibiteur de la DDC périphérique, qui peut aussi entraîner une augmentation de la dopamine périphérique [497]. De plus, la quasi-totalité des patients traités par L-DOPA l'est pour la maladie de Parkinson. Ainsi, chacun de ces facteurs (L-DOPA, inhibiteur de la DDC, maladie de Parkinson) peut être responsable de la diminution de l'incidence de la DMLA exsudative.

Nous avons alors choisi d'investiguer séparément les mécanismes sous-jacents possibles en utilisant de la L-DOPA, des inhibiteurs de la DDC, ainsi que des agonistes et antagonistes dopaminergiques sur :

- Des modèles murins *in vivo* de maladie de Parkinson induite au MPTP et des modèles de DMLA néovasculaire induite par du laser,
- Des cultures *ex vivo* d'explants choroïdiens
- De cultures cellulaires *in vitro* de cellules endothéliales choroïdiennes humaines.
- Nos données montrent que la perte des neurones dopaminergiques induite par le MPTP n'affecte pas directement la néovascularisation choroïdienne induite par du laser, mais qu'un traitement par la L-DOPA induit une augmentation significative de la signalisation du récepteur D2 qui réduit la taille des néovaisseaux. Expliquant ainsi une observation épidémiologique intrigante, nos résultats suggèrent fortement que les agonistes systémiques des récepteurs D2 peuvent constituer une thérapie complémentaire pour réduire le besoin en anti-VEGF chez les patients ayant une DMLA néovasculaire (**Article 3**).

II- EXPLORATION DE LA VOIE INFLAMMATOIRE

2.1 Développement d'un modèle *in vitro* de co-culture EPR – Monocytes (Articles 1 et 2)

2.1.1 Validation du modèle de co-culture

In vivo, l'EPR est un tissu particulièrement immunosuppresseur qui permet une élimination des leucocytes arrivant à son contact [79,501]. De manière physiologique, cette caractéristique immunosuppressive contribue à garder un espace sous rétinien, situé entre l'EPR et les segments externes des photorécepteurs, en état de « privilège immun », c'est-à-dire dépourvu de leucocytes mais aussi de cellules microgliales [50,52]. Le privilège immun oculaire est une adaptation physiologique de l'œil, prévenant l'accumulation de cellules immunes dans ses tissus et la réaction inflammatoire qui en découle. Cette réaction immunitaire serait délétère et induirait une destruction des cellules rétiniennes, essentielles pour la vision, et incapables de se régénérer [501]. La présence prolongée de PMs dans l'espace sous rétinien a d'ailleurs été retrouvée associée à une DMLA exsudative [54,502] ou atrophique [50,503], probablement en raison d'une sécrétion accrue de cytokines et de facteurs proangiogéniques [53,504,505].

Nous avons développé un modèle de co-culture mettant en contact des Mos humains avec une culture primaire d'EPR de porc pour reproduire cette interaction. Nous avons ainsi montré une diminution significative, de plus de 50%, du nombre de Mos lorsqu'ils étaient mis en co-culture avec de l'EPR par rapport aux Mos cultivés seuls. Cet effet serait dû aux signaux immunosuppresseurs sécrétés par l'EPR, provoquant l'apoptose des Mos à son contact [501].

Notre modèle de co-culture EPR de porc – Mos humains reproduirait donc *in vitro* l'interaction physiologique entre les cellules d'EPR et les Mos recrutés lors d'un stress tissulaire par exemple. Afin de confirmer ce modèle, nous avons utilisé un autre type de culture d'EPR, purifié à partir d'iPS humaines dérivées en EPR. Les résultats de la co-culture sur ce modèle étaient identiques à celui utilisant la culture primaire de porc.

2.1.2 L'activation des monocytes entraîne une résistance aux signaux immunosuppresseurs de l'EPR

Dans la DMLA, les PMs sont activés et s'accumulent dans la forme exsudative [506], et autour des lésions atrophiques dans la DMLA atrophique [50,51]. Les mécanismes par lesquels ces Mos s'activent dans l'espace sous rétinien ne sont pas précisément connus. Comme largement publié dans la littérature, nous avons utilisé du lipopolysaccharide (LPS) afin de stimuler les Mos fraîchement purifiés [507]. Ces Mos vont alors s'activer et sécréter des cytokines pro-inflammatoires, déclenchant ainsi la réponse immunitaire [507,508]. Dans notre modèle de co-culture, les Mos activés par du LPS développaient une survie accrue en réponse aux signaux immunosuppresseur de l'EPR.

2.1.3 Les monocytes activés provoquent des altérations de l'EPR

Dans l'ensemble de nos expériences, le nombre de cellules d'EPR comptabilisés après 24 heures d'incubation était toujours identique quelles que soient les conditions de co-culture, et l'utilisation du marquage TUNEL n'a pas permis de mettre en évidence une mort cellulaire de l'EPR. Ainsi, l'augmentation de la survie des Mos et donc la concentration en cytokines du milieu de culture n'entraînait pas la mort de ces cellules. Par contre, à l'aide d'analyses d'expression génétique et protéique, nous avons mis en évidence une large dérégulation des gènes impliqués dans le renouvellement du photopigment ou dans l'homéostasie de l'EPR. La dérégulation de ces gènes, notamment ceux impliqués dans le renouvellement du photopigment peut altérer la survie des photorécepteurs et entraîner leur disparition [509]. Le gène OTX2 (Orthodenticle homebox 2) joue un rôle clé dans le développement de l'œil et chez l'adulte. Il joue aussi un rôle important dans l'homéostasie du couple EPR-photorécepteur [510]. Dans nos modèles de co-culture, nous avons montré que ce gène était fortement dérégulé dans les conditions où les Mos étaient activés.

Nous en concluons donc que, dans les conditions de co-culture avec Mos activés, l'EPR ne subit pas de perte cellulaire pure, mais est le siège de nombreuses altérations d'expression génétique. Ces altérations touchent notamment les voies de renouvellement du photopigment visuel, indispensable pour l'initiation de l'influx visuel au niveau des cônes et des bâtonnets. La dérégulation de ce cycle pourrait ainsi entraîner une mort cellulaire sur la population des photorécepteurs [511,512].

2.1.4 Le TNF α , sécrété par les monocytes, induit les altérations sur l'EPR

Les Mos activés par du LPS sécrètent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, notamment par l'activation de la voie MyD88, impliquant le facteur de transcription NF κ B [513,514]. Après avoir étudié le profil sécrétoire des Mos activés, nous avons identifié le TNF α comme unique acteur de l'altération d'OTX-2 sur l'EPR. Cette cytokine est l'une des plus importante de la phase inflammatoire et est impliquée dans de nombreux processus biologiques, certains pouvant mener à l'apoptose cellulaire [515]. En plus de ce rôle sur OTX-2, une exposition de l'EPR au TNF α entraîne des altérations majeures de la cellule telle que la modification de son rôle de BHR, sa capacité d'immunosuppression, sa morphologie cellulaire, ainsi que sa polarité.

En conclusion, nous avons montré que le modèle *in vitro* de co-culture EPR-Mos développé permet de reproduire l'effet immunosuppresseur de l'EPR sur les Mos. Lorsque ces derniers sont activés, ils résistent à ces signaux et survivent mieux au contact de l'EPR. Les effets collatéraux de cette survie impliquent une diminution de la transcription de gènes nécessaires au maintien de l'homéostasie des cellules de l'EPR mais aussi du couple EPR-photorécepteurs. La surproduction induite de TNF α jouerait donc un rôle majeur dans les altérations de l'EPR.

ARTICLE 1 : Les monocytes activés résistent à leur élimination par l'EPR et dérégulent l'expression d'OTX-2 via le TNF α



Aging Cell (2017) 16, pp173–182

Doi: 10.1111/accel.12540

Activated monocytes resist elimination by retinal pigment epithelium and downregulate their OTX2 expression via TNF- α

Thibaud Mathis,^{1,2,3} Michael Housset,^{1,2} Chiara Eandi,^{1,2,4} Fanny Beguier,^{1,2} Sara Touhami,^{1,2} Sacha Reichman,^{1,2} Sebastien Augustin,^{1,2} Pauline Gondouin,^{1,2} José-Alain Sahel,^{1,2} Laurent Kodjikian,³ Olivier Goureau,^{1,2} Xavier Guillonneau^{1,2} and Florian Sennlaub^{1,2}

¹Institut de la Vision, 17 rue Moreau, 75012 Paris, France

²UPMC University of Paris 06, INSERM, CNRS, Sorbonne Universités, Paris, France

³Department of Ophthalmology, Croix-Rousses University Hospital, Hospices Civils de Lyon, University of medicine Lyon 1, 103 Grande rue de la Croix Rousse, 69317 Lyon Cedex 04, France

⁴Department of Clinical Science, Eye Clinic, University of Torino, Torino, Italy

Summary

Orthodenticle homeobox 2 (OTX2) controls essential, homeostatic retinal pigment epithelial (RPE) genes in the adult. Using cocultures of human CD14⁺ blood monocytes (Mos) and primary porcine RPE cells and a fully humanized system using human-induced pluripotent stem cell-derived RPE cells, we show that activated Mos markedly inhibit RPE OTX2 expression and resist elimination in contact with the immunosuppressive RPE. Mechanistically, we demonstrate that TNF- α , secreted from activated Mos, mediates the downregulation of OTX2 and essential RPE genes of the visual cycle among others. Our data show how subretinal, chronic inflammation and in particular TNF- α can affect RPE function, which might contribute to the visual dysfunctions in diseases such as age-related macular degeneration (AMD) where subretinal macrophages are observed. Our findings provide important mechanistic insights into the regulation of OTX2 under inflammatory conditions. Therapeutic restoration of OTX2 expression might help revive RPE and visual function in retinal diseases such as AMD.

Key words: age-related macular degeneration; monocytes; OTX2; retinal pigment epithelium; TNF- α ; visual cycle.

Introduction

Orthodenticle homeobox 2 (OTX2) is a key transcription factor for the development of the brain and sensory organs (Acampora *et al.*, 1995; Cantos *et al.*, 2000; Fossat *et al.*, 2006). Mutations of OTX2 in humans are associated with ocular malformation, pituitary defects, and mental retardation (Gorbenko Del Blanco *et al.*, 2012). During retina development, OTX2 controls the specification of the retinal pigment epithelium

(RPE), a monolayer of pigmented cells adjacent to the photoreceptors outer segments (POS). OTX2 expression is maintained in the adult RPE where it regulates the expression of a number of essential genes such as tyrosinase, and P protein, necessary for RPE melanogenesis to inhibit light back scatter (Martínez-Morales *et al.*, 2003; Housset *et al.*, 2013), and transferrin (TRF), an essential iron transporter (Housset *et al.*, 2013). It also regulates genes crucially involved in the retinol visual cycle: transthyretin (TTR), a retinol carrier, and retinol dehydrogenase 5 (RDH5) that re-isomerizes all-trans-retinal into 11-cis-retinal (Housset *et al.*, 2013). Complete OTX2 ablation in adult mice induces progressive photoreceptor degeneration (Housset *et al.*, 2013). Reduced OTX2 in RPE cells and therefore TTR and RDH5 expression likely leads to the impaired capacity to import and revert all-trans-retinal into 11-cis-retinal, therefore slowing the visual cycle, which increases the recovery time after bleach, as observed in RDH5-deficient patients (Cideciyan *et al.*, 2000). Interestingly, the early stages of age-related macular degeneration (AMD, a major cause of visual impairment) are also associated with a marked increase in recovery time after bleach before significant loss of RPE or photoreceptors occur (Owsley *et al.*, 2001; Flamendorf *et al.*, 2015), which suggests that the visual cycle is slowed before degeneration appears. The molecular reasons for these dysfunctions are unknown.

The RPE also expresses immunosuppressive factors, such as Fas ligand (FasL), that lead to a quick elimination of leukocytes (Griffith *et al.*, 1995; Levy *et al.*, 2015a) and participates in keeping the subretinal space physiologically devoid of immune cells (Gupta *et al.*, 2003; Combadière *et al.*, 2007; Lad *et al.*, 2015). In diseases such as AMD, subretinal immunosuppression is impaired and macrophages (M ϕ) accumulate subretinally around the RPE. They are found on the apical side of the RPE adjacent to atrophic zones that define geographic atrophy (GA, a late form of AMD), around choroidal neovascularizations, and around large drusen, sub-RPE debris deposits observed in early AMD (Gupta *et al.*, 2003; Combadière *et al.*, 2007; Lad *et al.*, 2015; Levy *et al.*, 2015a). Blood monocyte-derived CD14⁺CCR2⁺ M ϕ s invariably participate in this infiltration (Sennlaub *et al.*, 2013).

We here used a coculture model of fresh human CD14⁺ blood Mos and primary porcine RPE (pRPE) cells and a fully humanized system using human-induced pluripotent stem cell (iPS)-derived RPE (hiRPE) to mimic subretinal cellular interactions under physiological and pathological conditions. We demonstrate that TNF- α , secreted from activated Mos, mediates downregulation of OTX2 and essential RPE genes such as RDH5. Our data show how subretinal, chronic inflammation can affect RPE function, which likely contributes to the visual dysfunctions and later degeneration in diseases such as AMD where subretinal M ϕ s are observed.

Results

The RPE efficiently eliminates naïve, but not activated monocytes *in vitro*

Physiologically, mononuclear phagocytes (MPs) are quickly eliminated when injected subretinally due to RPE FasL expression *in vivo* (Levy *et al.*, 2015a). Mos have previously been shown to induce RPE

Correspondence

Thibaud Mathis, Croix Rousse University Hospital, Lyon, France. Tel.: (33) 4 26 10 94 31; fax: + (33) 4 26 73 29 87; e-mail: mathisthibaud@hotmail.fr and

Florian Sennlaub, Institut de la Vision, Paris, F-75012 France. Tel.: (33) 1 53 46 26 93; fax: + (33) 1 53 46 25 05; e-mail: florian.sennlaub@inserm.fr

Accepted for publication 25 August 2016

apoptosis, in conditions where their number exceeds the number of RPE cells (Yang *et al.*, 2009, 2011), which might correspond more to an autoimmune chorioretinitis type of setting. We here first cultured human CFSE-stained, blood-derived, magnetic bead-sorted CD14⁺Mos alone (Fig. 1A left panels and B uninterrupted lines) or in coculture in a 0.5/1 ratio (as determined by cell counts after 1 h of coculture) with confluent porcine primary RPE cells (pRPE, Fig. 1A right panels and B dotted lines) for up to 3 days. The cultures were either conducted in Dulbecco's modified Eagle's serum (DMEM) alone (Fig. 1A upper panels and B blue lines) or containing lipopolysaccharide (LPS) (Fig. 1A lower panels and B red lines) to simulate a pro-inflammatory micro-environment. After 24 h, we observed a strong reduction in green-fluorescent CFSE⁺Mos in the coculture condition that was significantly inhibited by LPS (Fig. 1A). LPS also induced a marked morphological change in the CFSE⁺Mos that appeared larger and stellate, compared with the control condition (Fig. 1A insets). At 24 h, automated counting of CFSE⁺DAPI⁺Mos revealed a significant 80% contraction of the Mo population in the coculture condition compared with the monoculture and the coculture at 1, 3, and 6 h (Fig. 1B). The reduction further decreased at 48, and 72 h (Fig. 1B). LPS did not significantly change the number of Mos in monoculture, or in the first 6 h of coculture, but the Mos resisted their elimination significantly when LPS was added to the coculture after 15 h, when a severe drop in naïve Mo numbers was observed. TUNEL staining of the coculture system did not reveal significant TUNEL⁺ nuclei numbers, likely because dying Mos detached from the RPE monolayer. However, transfer of any 24 h coculture supernatants to fresh wells did not lead to any cell adhesion, suggesting that the coculture did not contain any floating viable cells (data not shown).

We have previously shown that the RPE induces Mo apoptosis via FasL *in vivo* (Levy *et al.*, 2015a), which necessitates a cell-cell contact. We next cultured Mos in the upper chamber of a transwell with or without an RPE monolayer in the lower chamber or in the contact coculture as described above. Quantification of CFSE⁺DAPI⁺Mos at 24 h revealed no differences in cell density induced by the presence of RPE when Mos were cultured without contact in the transwells with or without LPS, contrary to contact cocultures (Fig. 1C), indicating that RPE/Mo contact is necessary for the Mo elimination. We next separately pre-incubated the monocytes (1 h) and RPE cells (24 h) with LPS (40 ng mL⁻¹) before the coculture in LPS-free DMEM. Quantification of CFSE⁺DAPI⁺Mo density after 24 h of coculture shows that pre-activation of Mos, but not pre-activation of the RPE, significantly reduced RPE-induced Mo elimination (Fig. 1D), similar to the condition when LPS was directly added to the coculture. The number of OTX2⁺DAPI⁺RPE nuclei, counted automatically by Arrayscan of OTX2 immunostained cultures, did not vary significantly between RPE monoculture and RPE/Mo coculture, be it with or without LPS (Fig. 1E). Counting of RPE cells using a zonula occludens 1 (ZO-1) stain that delimitates the RPE cell borders gave similar results (not shown) and showed no major morphological RPE changes in these conditions (Fig. 1E picture panels).

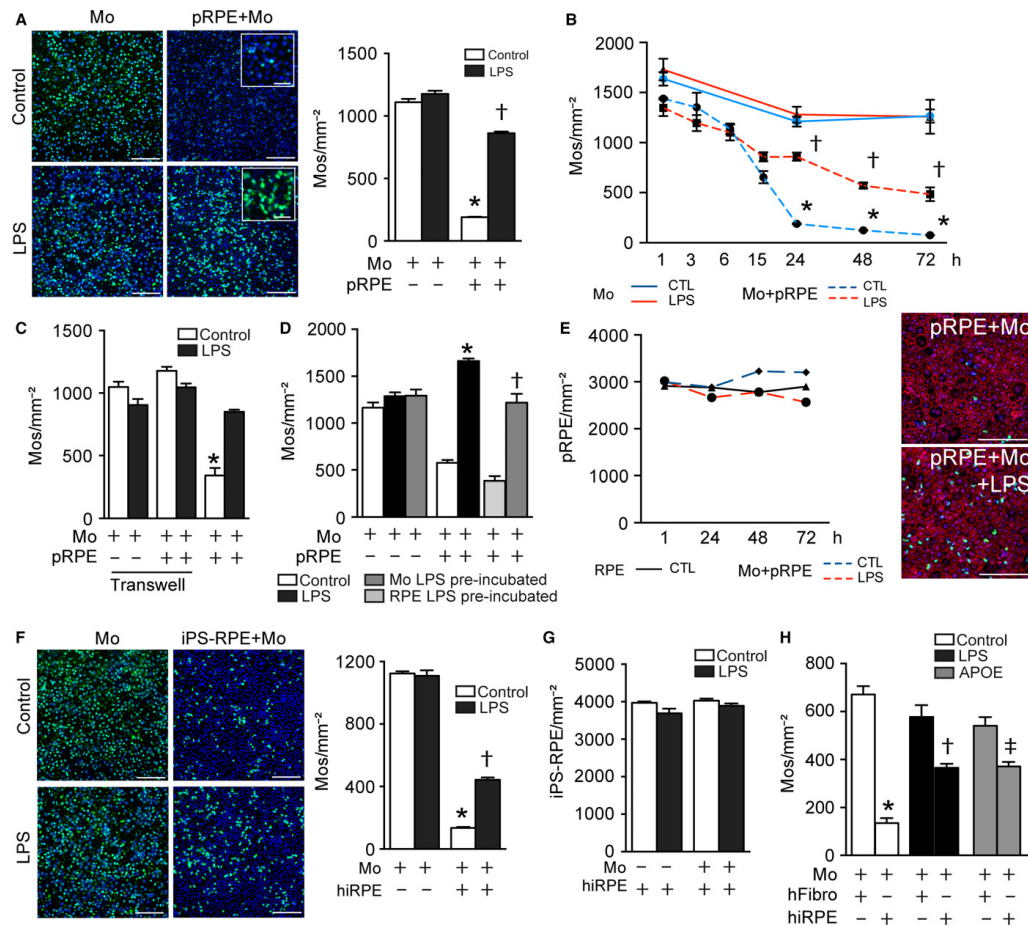
The above-described experiments were carried out with primary porcine RPE, which has the advantage to use primary RPE cells. To evaluate whether any of the results were due to interspecies incompatibilities in the coculture of human monocytes with porcine RPE cells, we next used human iPS-derived RPE (hiRPE) cells in a purely human coculture for 24 h (Fig. 1F). Similar to the results obtained with primary porcine RPE, hiRPE induced a strong contraction of human CFSE⁺Mo numbers at 24 h compared with Mo monocultures and this reduction was significantly inhibited by LPS (Fig. 1F). Again the number of OTX2⁺DAPI⁺RPE nuclei evaluated by OTX2

immunostaining showed no difference of RPE nuclei in any condition (Fig. 1G). We next compared Mo survival in cocultures with either hiRPE cells or human primary fibroblasts (hFibro) from which the hiRPE cells were derived. Twenty-four h of coculture clearly demonstrates that the transformation of hFibro into hiRPE cells induces the immunosuppressive phenotype (Fig. 1H). Accordingly, LPS induced an increase in Mo numbers in coculture with hiRPE but not with hFibro. To test whether a more AMD-relevant Mo stimulation induces a similar resistance to elimination, we added apolipoprotein E (APOE) to the coculture system. We previously showed that APOE, which is observed in subretinal MPs of AMD patients (Levy *et al.*, 2015a) and in MPs that express the AMD-risk isoform APOE2 (Levy *et al.*, 2015b), activates the CD14/TLR2/4-dependent innate immunity receptor cluster and induces inflammatory cytokines (Levy *et al.*, 2015a,b). Similar to LPS, recombinant APOE (but not heat-inactivated APOE, data not shown) induced a robust increase in Mo numbers in coculture with hiRPE but not with hFibro (Fig. 1H).

Taken together, our coculture conditions closely mimic the RPE immunosuppressive effect on leukocytes observed *in vivo* (Griffith *et al.*, 1995; Levy *et al.*, 2015b). The activation of Mos significantly prolonged their survival in contact with porcine and human RPE cells similar to AMD where MPs are observed on the apical side of RPE cells around geographic atrophy lesions, subretinal neovascularization, and large drusen (Gupta *et al.*, 2003; Combadière *et al.*, 2007; Lad *et al.*, 2015; Levy *et al.*, 2015a).

Activated Mos downregulate RPE OTX2 expression

OTX2 expression is maintained in the adult RPE where it regulates the expression of a number of essential RPE genes (Béby *et al.*, 2010; Housset *et al.*, 2013). Using OTX2 immunohistochemistry to positively identify RPE nuclei in the coculture experiments, we were able to accurately count the number of OTX2⁺DAPI⁺RPE nuclei, but also noticed that the intensity of the staining varied depending on the culture condition: The OTX2-staining intensity (Fig. 2A, red staining) was similar in pRPE monocultures without or with LPS (Fig. 2A, left panels) and similar to the Mo/pRPE coculture condition without LPS after 24 h (Fig. 2A upper right panel). However, when LPS was added to the coculture condition, the intensity of OTX2 fluorescence was greatly diminished (Fig. 2A, lower right panel). Quantitative analysis of the fluorescence intensity using the Arrayscan showed that OTX2-staining intensity was comparable in pRPE monoculture and Mo/pRPE cocultures at 24 h, except in the LPS coculture condition in which a very significant decrease was measured (Fig. 2A, graphic). This decrease was observed as soon as 6 h and throughout the experiment (Fig. 2B). Similarly, OTX2 fluorescence intensity was significantly diminished in human hiRPE cells after 24 h LPS- and APOE-stimulated cocultures compared with unstimulated cocultures and hiRPE cell monocultures (Fig. 2C). When we pre-incubated the monocytes and pRPE cells with LPS separately before their 24 h coculture, OTX2 immunofluorescent intensity again was significantly diminished by pre-activation of Mos, but not the pRPE, similar to the condition when LPS was directly added to the coculture (Fig. 2D). OTX2 mRNA quantification by RT-qPCR (Fig. 2E) and OTX2 protein by Western blot analysis (Fig. 2F) confirmed a significant reduction in OTX2 expression in the LPS coculture condition. The reduction in well above 50% of OTX2 expression observed in RT-qPCR and Western blot analysis is unlikely due to the dilution by surviving Mos in the coculture, as they only represent maximally 25% (1000 Mos mm⁻²; 3000pRPE mm⁻²; Fig. 1) of the cells in the LPS coculture condition.



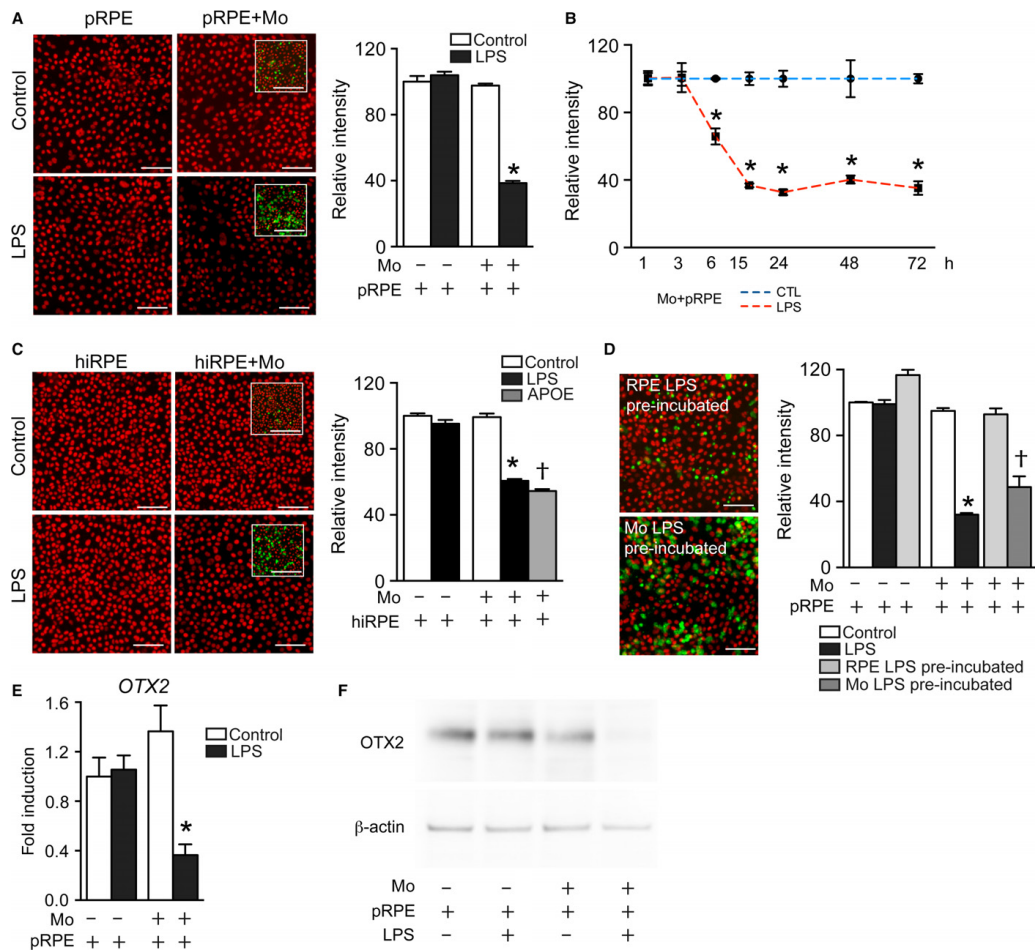


Fig. 2 Activated Monocytes downregulate RPE OTX2 expression. (A) Representative pictures of OTX2 immunohistochemistry of pRPE at 24 h in pRPE cultures (left panels) and pRPE/Mo cocultures (right panels), incubated without (upper panels) or with (lower panels) LPS. Red fluorescence: OTX2; green fluorescence: CFSE (inset, close-up view). Corresponding relative fluorescence intensity quantification of OTX2 fluorescence intensity ($n = 6$ /group; one-way ANOVA/Bonferroni test: pRPE+Mos+LPS versus any other group $*P < 0.0001$). (B) Relative fluorescence intensity quantification at indicated times of OTX2 fluorescence intensity in cocultures with (red line) or without (blue line) LPS ($n = 3$ /group; one-way ANOVA/Bonferroni test: pRPE+Mos versus pRPE+Mos+LPS $*P < 0.0001$ for each time point). (C) Representative pictures of OTX2 immunohistochemistry of hiRPE at 24 h in monoculture (left panels) and hiRPE/Mo cocultures (right panels), incubated without (upper panels) or with (lower panels) of LPS. Red fluorescence: OTX2; green fluorescence: CFSE (inset, close-up view). Corresponding relative fluorescence intensity quantification of OTX2 fluorescence intensity ($n = 6$ /group; one-way ANOVA/Bonferroni test: hiRPE+Mos+LPS versus any other group $*P < 0.0001$). (D) Representative pictures of OTX2 immunohistochemistry (red) of cocultures of LPS-pre-activated pRPE (upper panel), or LPS-pre-activated Mo (lower panel) before 24 h of LPS-free coculture in DMEM (green fluorescence: CFSE). Relative fluorescence intensity quantification at 24 h of OTX2 fluorescence intensity in control, LPS-activated, and LPS-pre-activated pRPE and Mo cocultures ($n = 3$ -4/group; one-way ANOVA/Bonferroni test: pRPE+Mos+LPS versus pRPE+Mos $*P < 0.0001$; pRPE+LPS-pre-activated Mo versus pRPE+Mos $\dagger P < 0.0001$). (E) Relative expression of OTX2-mRNA normalized with S26 expression quantified by RT-qPCR of 24 h pRPE culture or pRPE+Mo coculture, with or without LPS ($n = 8$ /group one-way ANOVA/Bonferroni test: pRPE+Mos+LPS versus any other group $*P < 0.05$). (F) Western blot analysis of OTX2- and β -actin protein after 24 h of the indicated culture conditions. Data information: All experiments were repeated three times with similar results. Mos: monocytes; pRPE: porcine primary retinal pigment epithelial cells; hiRPE: human-induced pluripotent stem cell-derived RPE cells; CTL: control; LPS: lipopolysaccharide. Scale bar A, C, and D: 50 μ m, insets 100 μ m.

In summary, our data demonstrate that RPE OTX2 expression in the coculture condition is inversely proportional to Mo survival. The fact that LPS had no effect on OTX2 expression in RPE

monocultures, but that LPS-pre-activated Mos did induce the downregulation shows that the activated Mos downregulate RPE OTX2 expression.

TNF- α mediates activated Mo-induced RPE OTX2 downregulation

To determine whether a diffusible factor secreted from the activated Mos was responsible for the RPE OTX2 downregulation, we first quantified OTX2 immunofluorescence intensity in coculture conditions where the Mos were placed in the upper chamber of a transwell insert. As described for Fig. 1C, the noncontact coculture condition leads to stable monocyte counts with and without LPS. Interestingly, OTX2 fluorescence intensity was significantly diminished in LPS-stimulated compared with nonstimulated transwell cultures and similar to the contact coculture condition (Fig. 3A), suggesting the existence of a diffusible factor. Indeed, supernatants from 24 h LPS-stimulated Mo/RPE cocultures, or Mo monocultures diminish OTX2 fluorescence intensity in pRPE culture compared with supernatants from unstimulated cocultures and Mo monocultures (Fig. 3B). Taken together, these results strongly suggested that a Mo-derived, LPS-induced, secreted, diffusible factor is responsible for the OTX2 downregulation.

Upon LPS stimulation, Mos secrete a variety of inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6, and TNF- α that can have a profound effect of neurons and stromal cells (Hanisch, 2002). In our Mo culture conditions, the 24-h LPS stimulation leads to IL-1 β , IL-6, and TNF- α concentrations of 2–10 ng mL⁻¹ (Fig. 3C). As the secreted cytokines undergo partial degradation during 24 h, we next tested whether recombinant human IL-1 β , IL-6, and TNF- α at concentrations of 2, 20, and 100 ng mL⁻¹ influenced OTX2 fluorescence intensity after 24 h of pRPE culture (Fig. 3D). Quantifications show that TNF- α strongly and dose dependently decreased the fluorescence intensity of OTX2, while IL-1 β and IL-6 induced no difference. Cotreatment with TNF- α , IL-6, and IL-1 β did not show any additional effect compared with TNF- α monotherapy (data not shown). OTX2 mRNA quantification by RT-qPCR (Fig. 3E) and OTX2 protein by Western blot analysis (Fig. 3F) confirmed the TNF- α strongly represses OTX2 expression. Next, we added an anti-TNF- α -blocking antibody to the Mo/pRPE coculture, which significantly inhibited the LPS-induced OTX2 fluorescence intensity downregulation compared with the control-IgG (Fig. 3G). Western blot analysis confirmed the partial restoration of OTX2 expression using the anti-TNF- α antibody (Fig. 3H). Interestingly, TNF- α inhibition in LPS-activated Mo/pRPE cocultures did not affect RPE immunosuppressivity (Fig. 3I).

Taken together, our results show that TNF- α , secreted from activated Mos, is sufficient to downregulate OTX2 in the RPE. Our experiments using an anti-TNF- α -blocking antibody demonstrate that TNF- α participates importantly in the RPE OTX2 downregulation observed in the activated Mo/RPE coculture.

Activated Mos lead to OTX2-dependent RPE gene downregulation

OTX2 regulates RPE genes that are crucially involved in homeostasis and notably the RPE part of the visual cycle (Housset et al., 2013; Masuda et al., 2014). We next analyzed the expression of TTR and RDH5, both essential for the visual cycle (Cavallaro et al., 1990; Yamamoto et al., 1999; Cideciyan et al., 2000), and TRF, an iron transport protein (He et al., 2007; Picard et al., 2015). mRNA quantification by RT-qPCR shows that TTR, TRF, and RDH5 transcription levels are not affected by LPS or the presence of Mos alone, but all three tested genes are severely downregulated in the LPS-activated Mo/RPE coculture (Fig. 4A–C). Again, incubation with recombinant TNF- α was sufficient to severely reduce the transcription levels of TTR, TRF, and RDH5 quantified by RT-qPCR (Fig. 4D–F).

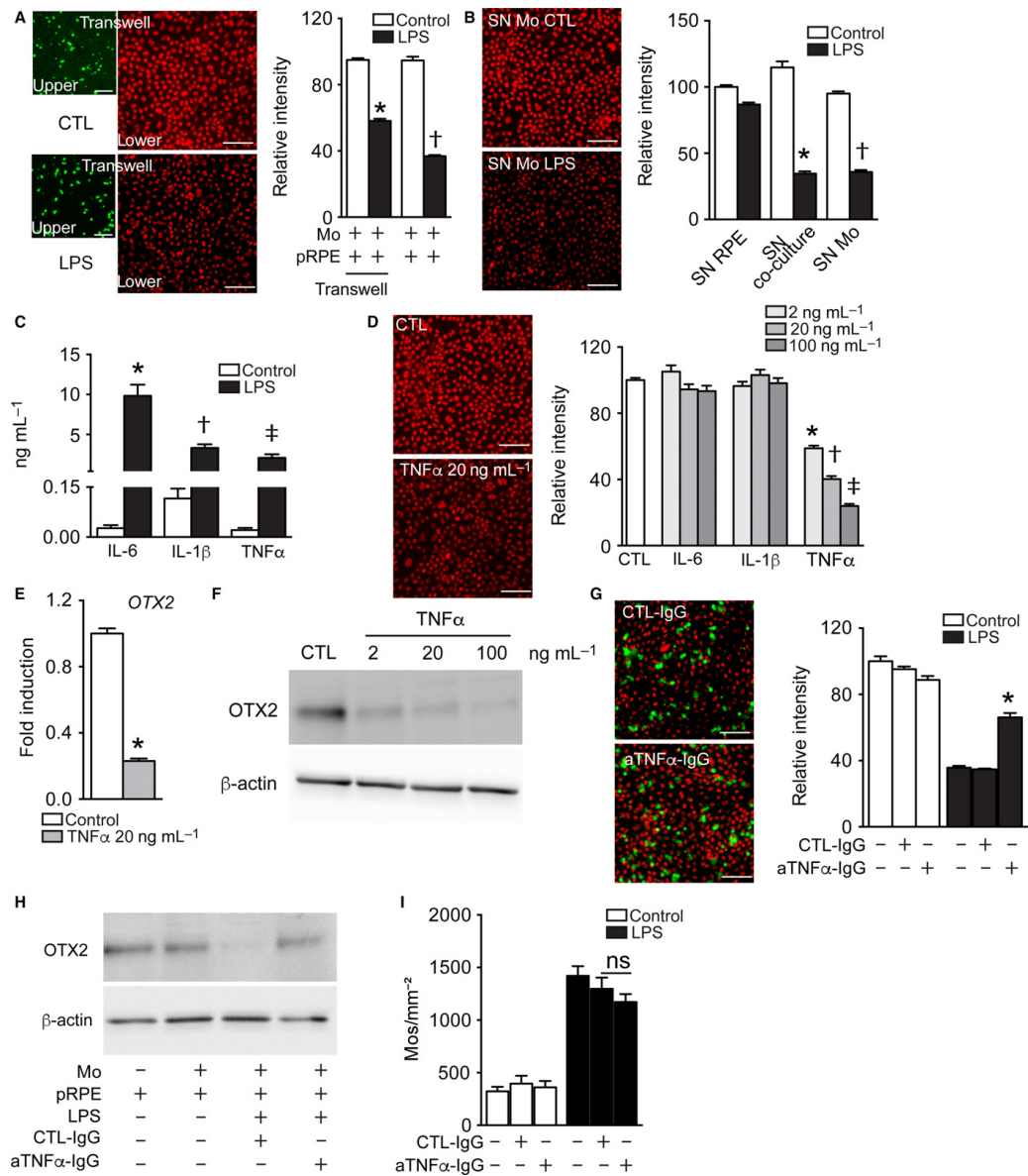
In summary, these results show that the reduced OTX2 expression induced by activated Mos or recombinant TNF- α is associated with a grave downregulation of the essential RPE genes it regulates (Fig. 4G).

Discussion

In vivo, the retinal pigment epithelium (RPE) is a particularly immunosuppressive tissue as it quickly eliminates adjacent leukocytes through multiple mechanisms that include FasL/FAS signaling (Griffith et al., 1995; Levy et al., 2015a). In fact, RPE allografts to nonimmune privileged sites (kidney capsule) of nonimmunocompromised, nonhistocompatible recipients, efficiently kill approaching immune effector cells (T cells, macrophages) and survive prolonged periods of time despite the induction of an adoptive immune response to the grafted cells (Wenkel & Streilein, 2000). Physiologically the RPE immunosuppressive capacities likely contribute to the anatomical particularity that the subretinal space, delimited by the RPE and the photoreceptor outer segments, is not only devoid of leukocytes in general, but also of resident microglial cells that are only located in the inner retina (Gupta et al., 2003; Combadière et al., 2007; Lad et al., 2015). Our coculture of blood-derived CD14⁺Mos and RPE closely mimics this immunosuppressive effect *in vitro*, as the number of Mos decreases dramatically between six and 24 h after they enter in contact with the RPE, similar to subretinally injected Mos *in vivo* (Levy et al., 2015a). We show that a cell–cell contact is necessary for their elimination, as the Mos were not eliminated if cultured in a noncontact scenario using transwell plates. Activation of the coculture by LPS very significantly inhibited the RPE-induced Mo elimination. The fact that pre-activation of Mos by LPS, but not the pre-activation of the RPE, led to a similar inhibition of Mo elimination clearly showed that the effect was due to the Mo activation. Interestingly, APOE, which we showed is strongly expressed in subretinal MPs in AMD, induces the secretion of inflammatory cytokines via the activation of the innate immunity receptor cluster and prolongs the survival of subretinally injected MPs *in vivo* (Levy et al., 2015a), had a similar effect than LPS. The resistance to elimination could either be due to an intrinsic resistance to RPE-induced cell death of activated Mo or the activated Mos might alter the immunosuppressive capacities of the RPE.

Human Mo cocultures with primary porcine RPE and human iPSC-derived RPE cells revealed similar results throughout the study, showing that possible interspecies incompatibilities had no effect on the observed phenotype.

Contrary to previous studies in which primary human RPE cells were used (Elner et al., 2003; Yang et al., 2009, 2011), CD14⁺Mos never induced pRPE or hiRPE apoptosis or major morphological changes in our coculture conditions. Even higher Mo/RPE cell ratios of LPS-activated CD14⁺Mos failed to induce RPE apoptosis in our hands (data not shown). These differences might be due to a more pronounced susceptibility of primary human RPE from aged donors (50–86 years) (Yang et al., 2011) compared with primary porcine RPE (prepared from young pigs) and hiRPE. However, we did observe that increased survival of Mos in contact with the RPE, either in activated cocultures or in RPE cultures with pre-activated Mos, invariably led to a strong decrease in RPE-OTX2 expression. We observed this diminution by quantitative OTX2 immunofluorescence intensity measurements, in RT-qPCRs and in Western blot analysis. Our data show that LPS had no direct effect on OTX2 expression in RPE, but that LPS-pre-activated Mos did induce the downregulation whether in contact or in noncontact transwell cultures. We show that TNF- α , secreted from

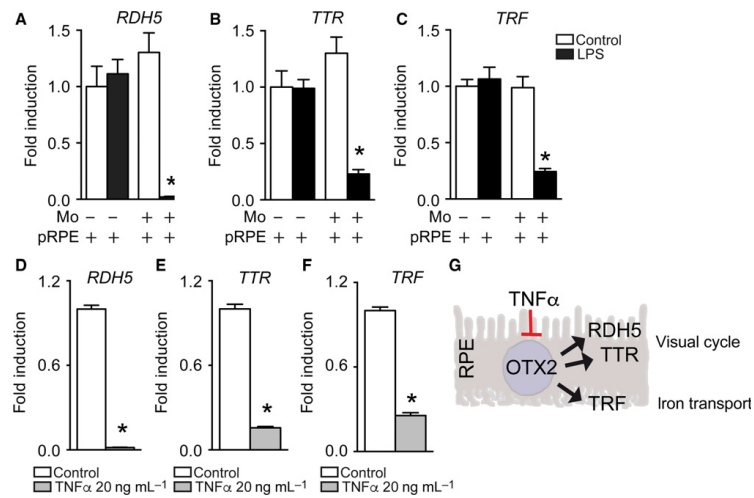


activated Mos, is sufficient to downregulate OTX2 in the RPE and that an anti-TNF- α -blocking antibody partially restores its expression in the activated Mo/RPE coculture. OTX2 expression is regulated by β -catenin during development (Westenskow *et al.*, 2009). TNF- α has

previously been shown to induce Dkk1, which inhibits WNT-dependent β -catenin nuclear translocation (Diarra *et al.*, 2007; Nava *et al.*, 2010). TNF- α might thereby inhibit β -catenin-dependent OTX2 downregulation in the RPE.

Fig. 3 TNF α mediates activated Mo-induced RPE OTX2 downregulation. (A) Representative images of the upper (green CFSE-stained Mos) and lower chambers (OTX2 immunohistochemistry of pRPE, red) of 24-h transwell cocultures and relative red fluorescence intensity quantification at 24 h ($n = 4$ /group, one-way ANOVA/Bonferroni test: TW pRPE+Mos+LPS versus any other TW group $*P < 0.0001$; pRPE+Mos+LPS versus any other contact coculture group $\dagger P < 0.0001$). (B) Representative images (OTX2 red) and relative fluorescence intensity quantification of OTX2-fluorescence intensity in pRPE culture after 24 h of incubation with conditioned supernatant (SN) from 24 h culture of pRPE, Mo/pRPE, or Mos with and without LPS. ($n = 6$ /group, one-way ANOVA/Bonferroni test: SN-pRPE+Mos+LPS versus SN-pRPE+Mos $*P < 0.0001$; SN-Mos+LPS versus SN-Mos $\dagger P < 0.0001$). (C) IL-6, IL-1 β and TNF- α ELISA of supernatants from 24 h Mo culture with or without LPS ($n = 8$ –12/group, Mann–Whitney U-test: IL-6 $*P = 0.0002$; IL-1 β $\dagger P = 0.002$; TNF- α $\dagger P < 0.0001$). (D) Representative pictures and relative fluorescence intensity quantification at 24 h of OTX2-fluorescence intensity in pRPE culture incubated with IL-6, IL-1 β , and TNF- α at different concentration (2 ng mL $^{-1}$, 20 ng mL $^{-1}$, and 100 ng mL $^{-1}$) compared with the control condition with no treatment ($n = 6$ –9/group one-way ANOVA/Bonferroni test: pRPE control versus any TNF- α group $*, \dagger, \ddagger P < 0.0001$). Red fluorescence: OTX2. (E) Relative expression of OTX2-mRNA normalized with S26 expression quantified by RT-qPCR of 24 h pRPE culture treated or not with 20 ng mL $^{-1}$ of TNF- α ($n = 12$ /group Mann–Whitney U-test: pRPE+TNF- α versus pRPE $*P < 0.0001$). (F) Western blot analysis of OTX2- and β -actin protein after 24 h of pRPE culture treated with TNF- α at 2, 20, and 100 ng mL $^{-1}$. (G) Representative images and relative fluorescence intensity quantification at 24 h of OTX2-immunohistochemistry (red) in pRPE/CFSE*Mo (green) coculture incubated with and without LPS and anti-TNF- α - or control-IgG ($n = 4$ –6/group, one-way ANOVA/Bonferroni test: pRPE+Mos+LPS+TNF- α versus pRPE+Mos+LPS+IgG $*P < 0.0001$). (H) Western blot analysis of OTX2- and β -actin protein after 24 h of pRPE/Mo coculture incubated with anti-TNF- α - or control-IgG. (I) Quantification of the density of CFSE*DAPI*Mo at 24 h of pRPE/CFSE*Mo coculture incubated with and without LPS and with anti-TNF- α - or control-IgG ($n = 4$ –6/group). Data information: All experiments were repeated twice with similar results. Mos: Monocytes; pRPE: porcine primary retinal pigment epithelial cells; CTL: control; LPS: lipopolysaccharide. Scale bars = 50 μ m.

Fig. 4 Activated Monocytes lead to essential OTX2-dependent RPE gene downregulation. (A–C) Relative expression of (A) RDH5-mRNA, (B) TTR-mRNA, and (C) TRF-mRNA normalized with S26 gene expression quantified by RT-qPCR in 24-h pRPE monoculture or pRPE+Mo coculture, with or without LPS ($n = 6$ /group one-way ANOVA/Bonferroni test: pRPE+Mos+LPS versus any other group $*P < 0.0001$). (D–F) Relative expression of (D) RDH5-mRNA, (E) TTR-mRNA, and (F) TRF-mRNA normalized with S26 gene expression quantified by RT-qPCR in 24 h pRPE culture with or without 20 ng mL $^{-1}$ of TNF- α ($n = 6$ /group Mann–Whitney U-test: pRPE+TNF- α versus pRPE $*P = 0.0022$). (G) Graphical summary. Data information: All experiments were repeated twice with similar results. Mos: Monocytes; pRPE: porcine primary retinal pigment epithelial cells; CTL: control; LPS: lipopolysaccharide.



OTX2 is a key transcription factor in the adult RPE where it regulates the expression of a number of essential genes involved in RPE melanogenesis, iron transport, and the retinal visual cycle. We here show that the observed alterations in OTX2 expression, under LPS-induced inflammatory conditions or by recombinant TNF- α , are associated with a grave downregulation of essential RPE genes it regulates, such as *TRF*, *TTR*, and *RDH5*. *TTR* and *RDH5*, together with RPE65 and *LRAT*, are necessary to re-isomerize all-trans-retinal into 11-cis-retinal essential for rhodopsin function. Dysfunction of the RPE part of the visual cycle leads to an increase in recovery time in the scotopic ERG after bleach, as it takes more time to reproduce 11-cis-retinal, exemplified in *RDH5*-deficient patients (Cideciyan et al., 2000). Interestingly, early AMD patients also present a marked increase in recovery time after bleach (Owsley et al., 2001; Flamendorf et al., 2015). These functional differences appear before significant loss of RPE and likely reflect a diminished efficiency of the RPE component of the visual cycle. In our study, we used LPS, which is unlikely to play a direct role in AMD, but also APOE, which we showed is strongly expressed in subretinal MPs in AMD (Levy et al., 2015a), to activate the Mos *in vitro*. TNF- α can be induced by diverse stimuli and patients with the CFH AMD-risk variant

are associated with higher systemic levels of TNF- α (Cao et al., 2013), and patients with monocytes that express the greatest amount of TNF- α have higher prevalence of choroidal neovascularization (Cousins, 2004). Others and we have previously shown that large drusen (that characterize early AMD) are foci of subretinal MP accumulation (Sennlaub et al., 2013; Lad et al., 2015; Levy et al., 2015a). Even though there is not yet direct evidence for OTX2 downregulation, it is tempting to speculate that TNF- α , produced by infiltrating MPs, induces a slowing of the visual cycle in early AMD, before RPE lesions become evident.

Interestingly, inflammation/TNF- α -dependent OTX2 downregulation might also have implications in congenital microphthalmia and auditory defects, common after intrauterine infections, notably with cytomegalovirus (CMV) (Becroft, 1981). CMV has been shown to potently induce TNF- α (Smith et al., 1992), which in turn might downregulate OTX2 necessary for eye and ear development (Acampora et al., 1995; Cantos et al., 2000; Fossat et al., 2006).

Taken together, our study reveals a novel link between inflammation and OTX2-related functions. In development, inflammation-induced downregulation of OTX2 might participate in malformation, and in the adult it could explain RPE dysfunction in diseases such as early AMD.

Therapeutic inhibition of inflammation or restoration of *OTX2* expression might help restore RPE function in retinal diseases with a subretinal inflammatory component.

Experimental procedures

Porcine RPE cell culture

Primary porcine RPE cells were isolated as previously described (Arnault *et al.*, 2013). Porcine eyes were bought at a local slaughterhouse (Guy Harang, Houdan, France) in agreement with the local regulatory department and the slaughterhouse veterinarians. This procedure adheres to the European initiative for restricting animal experimentation because not a single animal was killed for our experimentation. Porcine eyes were obtained 2 or 3 h after enucleation in CO₂-independent serum (Thermo Fisher Scientific). Eyes were cleaned for muscles and immersed few minutes in an antiseptic solution (Pursept-A Xpress, Merz Hygiene GmbH). Anterior segment of the bulb was removed, as well as lens, vitreous, and retina. Each eye cup was washed 2 times with PBS (Thermo Fisher Scientific) and incubated for 1 h at 37 °C with 0.25% trypsin–EDTA (Thermo Fisher Scientific). RPE cells were pipetted off the choroid and resuspended in Dulbecco's modified Eagle's serum (DMEM, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 20% fetal calf serum (FCS, Thermo Fisher Scientific) and 1% antibiotics penicillin/streptomycin (PS). Purified cells were then seeded on a 60-mm Petri dish in DMEM-FCS20%-PS1% and incubated with a controlled atmosphere at 5% CO₂ at 37 °C. The culture medium was changed 24 h after the seeding. When cells were confluent, 0.05% trypsin–EDTA was added for 5 min at 37 °C to detach the RPE cells. They were finally seeded on 96-well culture plate (Corning) at the concentration of 75 000 cells/well in DMEM-FCS20%-PS1%. Confluence state was obtained after 3 days in culture at 37 °C, 5% of CO₂. Cells were used the fourth day.

Human foreskin fibroblast and induced pluripotent stem cell-derived RPE cells

Human iPS cells were derived from fibroblasts as previously described (Reichman *et al.*, 2014) and cultivated on feeder cells that were cultivated without FGF-2 for 48 h. Then, the ReproStem medium (Reprocell, Ozyme) was removed and replaced by a proneural medium (DMEM-F12 supplemented with 1% N2 and 0.1% penicillin/streptomycin, Thermo Fisher Scientific). The medium was changed every 2 days until apparition of pigmented cells. Patches of pigmented cells were cut with a needle and coated in a Geltrex matrix (Thermo Fisher Scientific). Once confluence obtained, hiRPE cells were characterized by RT-qPCR and immunocytochemistry using specific markers of RPE cells (Reichman *et al.*, 2014). Cells were used after a maximum of two passages. In our study, human foreskin fibroblasts and RPE cells differentiated from three different human iPS-RPE cells lines were used (Reichman *et al.*, 2014).

Human blood monocyte isolation

Human blood Mos from healthy donor were purified after written and informed consent in the Centre National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts (Paris). Briefly, peripheral mononuclear cells from blood of healthy donor were obtained by Ficoll gradient centrifugation, washed three times, and were sorted with EasySep Human Monocyte Enrichment Cocktail without CD16 Depletion kit (StemCell Technologies). Purified monocytes were then labeled with 488-nm Cell Trace CFSE (Thermo Fisher Scientific) and cultured.

Coculture and treatments

The day before experiment, RPE cells were serum-starved. A total of 100 000 freshly purified human monocytes were added to confluent fibroblasts or RPE cells in DMEM-PS1%. Treatments were applied directly to the culture medium. To stimulate Mos, we used lipopolysaccharide (LPS) of *E. Coli* (Sigma-Aldrich, 40 ng mL⁻¹) or apolipoprotein E (APOE isoform 3, Leinco Technologies, 10 μ g mL⁻¹). In specific experiments, cells were incubated with the indicated recombinant human proteins (TNF- α , IL-6, and IL-1 β), obtained from R&D. Blocking goat anti-human TNF- α (R&D) and mouse anti-human IgG (R&D) antibodies were used at 25 μ g mL⁻¹. Cells were incubated at 37 °C for 24 h or more for further experimentation. At the end of coculture, cells were washed two times with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde (PAF) for 10 min. Alternatively, supernatants were removed and RA1 or RIPA lysis buffer was added on cells to perform real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) or Western blot assays, respectively.

Immunofluorescence microscopy

Fixed cells were washed twice in PBS and incubated for 2 min in a permeabilization solution (freshly prepared 0.1% triton and 0.1% sodium citrate in PBS). Cells were blocked for 1 h in PBS and triton 0.1% containing 5% horse serum (Thermo Fisher Scientific) and incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies (polyclonal goat anti-human OTX2, 1/500, R&D; monoclonal rat anti-mouse ZO-1, 1/300, Millipore) diluted in PBS triton 0.1% and 1% horse serum. Cultures were then incubated for 1 h at room temperature with the secondary antibody produced in Donkey (AlexaFluor 647 nm, 1/500, Thermo Fisher Scientific), and nuclei were counterstained with Hoechst (1/1000, Sigma-Aldrich). Cells were washed twice in PBS and observed under fluorescent microscope (Arrayscan VTI HCS Reader, Thermo Fisher Scientific). Twenty-five fields per well were analyzed and recorded by Arrayscan software (HCS iDev Cell Analysis Software, Thermo Fisher Scientific).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

To determine the amount of human TNF- α , IL-6, and IL-1 β in the supernatant of the cocultures, we used the human ELISA DuoSet kit (R&D Systems). Briefly, 96-well plates were coated with a capture antibody overnight at room temperature (RT). After washing the wells, the plate was blocked in buffer containing bovine serum albumin (BSA) for 1 h. After a step of washes, samples or standards were added and incubated for 2 h. After washing, detection antibodies were added and incubated for an additional 2 h. Wells were then washed and a streptavidin–HRP solution was added for 20 min. After a final step of washes, substrate solution (mixture of H₂O₂ and tetramethylbenzidine) was added for 20 min. After addition of 50 μ l of stop solution (H₂SO₄), the optical density of each well is measured at 450 nm using a spectrofluorometer (Tecan).

RT-PCR

Total RNA was isolated with Nucleospin RNAiI (Macherey Nagel). RNA yields were then measured at 260 nm using the NanoDrop™ 8000 spectrophotometer. Typically, concentrations of RNA from our cell culture are comprised between 30 and 40 ng μ L⁻¹. Single-strand cDNA was synthesized using 1 μ g of total mRNA, pretreated with DNase amplification grade, using oligo-dT as primer and superscript II reverse

transcriptase (Thermo Fisher Scientific). For real-time PCR, 1/100 of cDNA was incubated with the polymerase and the appropriate amounts of nucleotides (PowerSYBR Green PCR mix, Applied Biosystems). qPCR was realized by the StepOne Plus real-time PCR system (Applied Biosystems). Results were normalized with expression of RPS26. PCRs were performed in 45 cycles of 15s at 95 °C, 45s at 60 °C. Primers for RT-PCR were purchased from IDT. Sequences are as follows: OTX2 forward 5'-CCCACTGTGATCCCTTGT-3'; OTX2 reverse 5'-GGGGACTGATTGAGATGGCT-3'; RDH5 forward 5'-GCTGAATGTGAACACGCTGG-3'; RDH5 reverse 5'-GAAGAAACACAGGCTCCACGA-3'; TRF forward 5'-TCCGCAGAAAACACCGAAGA-3'; TRF reverse 5'-ACACAGTTTTACCCTCAGTT-3'; TTR forward 5'-TGGAAGGCACCTGG-CATTTC-3'; TTR reverse 5'-GGTGGAGTAAGAGTAGGGGC-3'; RPS26 forward 5'-TCGATGCCTATGTGCTTCCC-3'; RPS26 reverse 5'-CAG-CACCCGACAGTGCTAAAT-3'.

Western blotting

A dosage of the protein lysate was performed using the BiCinchoninic acid Assay (BCA) test with a standard range of BSA. Twenty micrograms of total cell lysates in SDS sample buffer with reducing agent was denaturated at 70 °C for 10 min and loaded on a 4–12% bis-tris gel. Migration was done at 100V in running buffer, and proteins were transferred to a nitrocellulose membrane at 30V for 1 h30 in transfer buffer. Control of the transfer quality was done by coloration of the membranes with Red Ponceau dye before the saturation step with TBS-T (25 mM Tris, 150 mM NaCl, Tween 20X 0.1%) containing 5% of skimmed milk. Membranes were washed 3 times with TBS-T before incubation overnight with the primary antibody anti-OTX2 (Polyclonal Goat anti-human OTX2, 1/500, R&D), or anti- β -actin (monoclonal mouse anti- β -actin, 1/1000, Sigma-Aldrich) at 4 °C. After three TBS-T washes, membranes were incubated at room temperature for 1 h with the secondary antibody coupled to peroxidase (HRP). The revelation by chemiluminescence is done using the ECL prime kit reagent and pictures are obtained with a CCD camera (Fusion).

Statistical analysis

Graph prism 6 (GraphPad Software) was used for data analysis and graphic representation. All values are reported as mean $\pm$ standard error of the means (SEM). Statistical analysis was performed by Mann–Whitney U-test to compare 2 groups. When more groups had to be compared, one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test was used (multiple comparison). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Acknowledgments

We wish to thank A. Potey and M. Lechuga from the high-throughput screening platform, supported by Department de Paris and by Region Ile de France, and Sophie Lavalette for invaluable technical assistance.

Funding

This work was supported by grants from INSERM, ANR MACLEAR (ANR-15-CE14-0015-01), Labex Lifesenses, Carnot, and by the Association de Prévoyance Santé de ALLIANZ. This work was performed in the frame of the LABEX LIFESENSES [ANR-10-LABX-65] supported by the ANR within the Investissements d'Avenir program [ANR-11-IDEX-0004-02].

Conflict of interest

None declared

References

- Acampora D, Mazan S, Lallemand Y, Avantaggiato V, Maury M, Simeone A, Brûlet P (1995) Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Dev. Camb. Engl.* **121**, 3279–3290.
- Arnault E, Barrau C, Nanteau C, Gondouin P, Bigot K, Viénot F, Gutman E, Fontaine V, Villette T, Cohen-Tannoudji D, Sahel J-A, Picaud S (2013) Phototoxic action spectrum on a retinal pigment epithelium model of age-related macular degeneration exposed to sunlight normalized conditions. *PLoS ONE* **8**, e71398.
- Béby F, Housset M, Fossat N, Le Greneur C, Flamant F, Godement P, Lamonerie T (2010) *Otx2* gene deletion in adult mouse retina induces rapid RPE dystrophy and slow photoreceptor degeneration. *PLoS ONE* **5**, e11673.
- Becroft DM (1981) Prenatal cytomegalovirus infection: epidemiology, pathology and pathogenesis. *Perspect. Pediatr. Pathol.* **6**, 203–241.
- Cantos R, Cole LK, Acampora D, Simeone A, Wu DK (2000) Patterning of the mammalian cochlea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 11707–11713.
- Cao S, Ko A, Partanen M, Pakzad-Vaezi K, Merkur AB, Albani DA, Kirker AW, Wang A, Cui JZ, Forooghian F, Matsubara JA (2013) Relationship between systemic cytokines and complement factor H Y402H polymorphism in patients with dry age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* **156**, 1176–1183.
- Cavallaro T, Martone RL, Dwork AJ, Schon EA, Herbert J (1990) The retinal pigment epithelium is the unique site of transthyretin synthesis in the rat eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **31**, 497–501.
- Cideciyan AV, Haeseleer F, Fariss RN, Aleman TS, Jang GF, Verlinde CL, Marmor MF, Jacobson SG, Palczewski K (2000) Rod and cone visual cycle consequences of a null mutation in the 11-cis-retinol dehydrogenase gene in man. *Vis. Neurosci.* **17**, 667–678.
- 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. *J. Clin. Invest.* **117**, 2920–2928.
- Cousin SW, Espinosa-Heidmann DG, Csaky KG (2004) Espinosa-Heidmann DG & Csaky KG (2004) Monocyte activation in patients with age-related macular degeneration: a biomarker of risk for choroidal neovascularization? *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* **122**, 1013–1018.
- Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, Korb A, Smolen J, Hoffmann M, Scheinecker C, van der Heide D, Landewe R, Lacey D, Richards WG, Schett G (2007) Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat. Med.* **13**, 156–163.
- Elnér SG, Yoshida A, Bian Z-M, Kindezeliskii AL, Petty HR, Elnér VM (2003) Human RPE cell apoptosis induced by activated monocytes is mediated by caspase-3 activation. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **101**, 77–89. discussion 89–91.
- Flamendorf J, Agrón E, Wong WT, Thompson D, Wiley HE, Doss EL, Al-Holou S, Ferris FL, Chew EY, Cukras C (2015) Impairments in Dark Adaptation Are Associated with Age-Related Macular Degeneration Severity and Reticular Pseudodrusen. *Ophthalmology* **122**, 2053–2062.
- Fossat N, Chatelain G, Brun G, Lamonerie T (2006) Temporal and spatial delineation of mouse *Otx2* functions by conditional self-knockout. *EMBO Rep.* **7**, 824–830.
- Gorbenko Del Blanco D, Romero CJ, Diaczok D, de Graaff LCG, Radovick S, Hokken-Koelega ACS (2012) A novel OTX2 mutation in a patient with combined pituitary hormone deficiency, pituitary malformation, and an underdeveloped left optic nerve. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* **167**, 441–452.
- Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA (1995) Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* **270**, 1189–1192.
- Gupta N, Brown KE, Milam AH (2003) Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* **76**, 463–471.
- Hanisch U-K (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* **40**, 140–155.

- He X, Hahn P, Iacovelli J, Wong R, King C, Bhisitkul R, Massaro-Giordano M, Dunaief JL (2007) Iron homeostasis and toxicity in retinal degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* **26**, 649–673.
- Housset M, Samuel A, Ettaiche M, Bemelmans A, Béby F, Billon N, Lamonerie T (2013) Loss of Otx2 in the adult retina disrupts retinal pigment epithelium function, causing photoreceptor degeneration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **33**, 9890–9904.
- 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 Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **253**, 1941–1945.
- Levy O, Lavalette S, Hu SJ, Housset M, Raoul W, Eandi C, Sahel J-A, Sullivan PM, Guillonneau X, Sennlaub F (2015a) APOE Isoforms Control Pathogenic Subretinal Inflammation in Age-Related Macular Degeneration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **35**, 13568–13576.
- Levy O, Calippe B, Lavalette S, Hu SJ, Raoul W, Dominguez E, Housset M, Paques M, Sahel J-A, Bemelmans A-P, Combadiere C, Guillonneau X, Sennlaub F (2015b) Apolipoprotein E promotes subretinal mononuclear phagocyte survival and chronic inflammation in age-related macular degeneration. *EMBO Mol. Med.* **7**, 211–226.
- Martínez-Morales JR, Dolez V, Rodrigo I, Zaccarini R, Leconte L, Bovolenta P, Saule S (2003) OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation. *J. Biol. Chem.* **278**, 21721–21731.
- Masuda T, Wahlin K, Wan J, Hu J, Maruotti J, Yang X, Iacovelli J, Wolkow N, Kist R, Dunaief JL, Qian J, Zack DJ, Esumi N (2014) Transcription factor SOX9 plays a key role in the regulation of visual cycle gene expression in the retinal pigment epithelium. *J. Biol. Chem.* **289**, 12908–12921.
- Nava P, Koch S, Laukoetter MG, Lee WY, Kolegraff K, Capaldo CT, Beeman N, Addis C, Gerner-Smidt K, Neumaier I, Skerra A, Li L, Parkos CA, Nusrat A (2010) Interferon- γ Regulates Intestinal Epithelial Homeostasis through Converging β -Catenin Signaling Pathways. *Immunity* **32**, 392–402.
- Owsley C, Jackson GR, White M, Feist R, Edwards D (2001) Delays in rod-mediated dark adaptation in early age-related maculopathy. *Ophthalmology* **108**, 1196–1202.
- Picard E, Le Rouzic Q, Oudar A, Berdugo M, El Sanharawi M, Andrieu-Soler C, Naud M-C, Jonet L, Latour C, Klein C, Galiacy S, Malecaze F, Coppin H, Roth M-P, Jeanny J-C, Courtois Y, Behar-Cohen F (2015) Targeting iron-mediated retinal degeneration by local delivery of transferrin. *Free Radic. Biol. Med.* **89**, 1105–1121.
- Reichman S, Terray A, Slembrouck A, Nanteau C, Orioux G, Habeler W, Nandrot EF, Sahel J-A, Monville C, Goureau O (2014) From confluent human iPS cells to self-forming neural retina and retinal pigmented epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 8518–8523.
- 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 J-L, Behar-Cohen F, Sahel J-A, Guillonneau X, Raoul W, Combadiere C (2013) CCR2(+) monocytes infiltrate atrophic lesions in age-related macular disease and mediate photoreceptor degeneration in experimental subretinal inflammation in Cx3cr1 deficient mice. *EMBO Mol. Med.* **5**, 1775–1793.
- Smith PD, Saini SS, Raffeld M, Manischewitz JF, Wahl SM (1992) Cytomegalovirus induction of tumor necrosis factor-alpha by human monocytes and mucosal macrophages. *J. Clin. Invest.* **90**, 1642–1648.
- Wenkel H, Streilein JW (2000) Evidence that retinal pigment epithelium functions as an immune-privileged tissue. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 3467–3473.
- Westenskow P, Piccolo S, Fuhrmann S (2009) Beta-catenin controls differentiation of the retinal pigment epithelium in the mouse optic cup by regulating Mitf and Otx2 expression. *Dev. Camb. Engl.* **136**, 2505–2510.
- Yamamoto H, Simon A, Eriksson U, Harris E, Berson EL, Dryja TP (1999) Mutations in the gene encoding 11-cis retinol dehydrogenase cause delayed dark adaptation and fundus albipunctatus. *Nat. Genet.* **22**, 188–191.
- Yang D, Elner SG, Lin L-R, Reddy VN, Petty HR, Elner VM (2009) Association of superoxide anions with retinal pigment epithelial cell apoptosis induced by mononuclear phagocytes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 4998–5005.
- Yang D, Elner SG, Chen X, Field MG, Petty HR, Elner VM (2011) MCP-1-activated monocytes induce apoptosis in human retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 6026–6034.

ARTICLE 2 : L'exposition chronique au TNF α induit une dédifférenciation des cellules d'EPR

Touhami et al. *Journal of Neuroinflammation* (2018) 15:85
<https://doi.org/10.1186/s12974-018-1106-8>

Journal of Neuroinflammation

RESEARCH

Open Access



Chronic exposure to tumor necrosis factor alpha induces retinal pigment epithelium cell dedifferentiation

Sara Touhami^{1,2*} , Fanny Beguier¹, Sébastien Augustin¹, Hugo Charles-Messance¹, Lucile Vignaud¹, Emeline F. Nandrot¹, Sacha Reichman¹, Valérie Forster¹, Thibaud Mathis¹, José-Alain Sahel^{1,3}, Bahram Bodaghi², Xavier Guillonueau¹ and Florian Sennlaub¹

Abstract

Background: The retinal pigment epithelium (RPE) is a monolayer of pigmented cells with important barrier and immuno-suppressive functions in the eye. We have previously shown that acute stimulation of RPE cells by tumor necrosis factor alpha (TNF α) downregulates the expression of OTX2 (Orthodenticle homeobox 2) and dependent RPE genes. We here investigated the long-term effects of TNF α on RPE cell morphology and key functions in vitro.

Methods: Primary porcine RPE cells were exposed to TNF α (at 0.8, 4, or 20 ng/ml per day) for 10 days. RPE cell morphology, phagocytosis, barrier- and immunosuppressive-functions were assessed.

Results: Chronic (10 days) exposure of primary RPE cells to TNF α increases RPE cell size and polynucleation, decreases visual cycle gene expression, impedes RPE tight-junction organization and transepithelial resistance, and decreases the immunosuppressive capacities of the RPE. TNF α -induced morphological- and transepithelial-resistance changes were prevented by concomitant Transforming Growth Factor β inhibition.

Conclusions: Our results indicate that chronic TNF α -exposure is sufficient to alter RPE morphology and impede cardinal features that define the differentiated state of RPE cells with striking similarities to the alterations that are observed with age in neurodegenerative diseases such as age-related macular degeneration.

Keywords: Retinal pigment epithelium, Tumor necrosis factor alpha, Transforming growth factor beta, Age-related macular degeneration, Neuroinflammation, Neurodegenerative disease

Background

The retinal pigment epithelium (RPE) is a monolayer of polarized pigmented cells, located between the photo-receptor outer segments (POS) and the choroid. These highly differentiated cells play a crucial role in the visual cycle, the recycling of POS, the formation of the outer blood-retinal barrier [1], and in providing immunosuppressive signals that eliminate infiltrating immune cells from the subretinal space [2].

With age, RPE cells decline in number and the percentage of multinucleated RPE cells increases [3, 4]. Enlarged, irregularly shaped, multinucleated RPE cells are also found in increased numbers in the vicinity of drusen that define early intermediate age-related macular degeneration (AMD) [5]. AMD is also associated with dysfunctional RPE: the visual cycle is slowed, evidenced by an increase of recovery time after bleach [6, 7]; the outer blood-retinal barrier is breached, illustrated by subretinal neovascularization, edema, and macrophages (M ϕ) that accumulate subretinally around the RPE [2]. At later stages the RPE degenerates, forming atrophic zones that define geographic atrophy (GA), the untreatable late form of AMD. Although it seems evident that RPE dysfunction and death is a pivotal part of AMD pathogenesis, it is not yet clear what leads to and aggravates the decay.

* Correspondence: saratouhami@gmail.com

¹Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, 17 rue Moreau, F-75012 Paris, France

²Department of Ophthalmology, Reference Center in Rare diseases, DHU Sight Restore, Hôpital Pitié Salpêtrière, University Paris VI, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

We and others previously showed that Mφs accumulate on the apical side of the RPE adjacent to the atrophic zones that define GA, around choroidal neovascularizations (CNV) and around large drusen in intermediate AMD [2, 8–12]. Using a co-culture model, we recently demonstrated that Mφ-derived tumor necrosis factor alpha (TNFα) acutely downregulates the transcription factor orthodenticle homeobox 2 (OTX2) that is constitutively expressed in RPE cells, where it controls the expression of a number of essential genes. TNFα is a potent inflammatory cytokine, mainly produced by activated Mφs and T-cells, with a broad range of biological activities [13]. A possible role of TNFα in age- and AMD-related RPE changes is also suggested by the observation that plasmatic TNFα concentrations increase with age [14, 15] and are further increased in complement factor H (CFH) AMD-risk variant carriers [16]. Furthermore, TNFα expression in monocyte-derived Mφs increases with the age of the donor [17, 18] and AMD patients whose monocyte-derived Mφs express the greatest amount of TNFα have a higher prevalence of CNV [19].

We here show that chronic (10 days) exposure of primary RPE cells to TNFα increases RPE cell size and polynucleation, decreases visual cycle gene expression, impedes RPE tight-junction organization and transepithelial resistance, and decreases the immunosuppressive capacities of the RPE. Some, but not all, of these effects were due to TNFα-induced transforming growth factor β expression.

Taken together our results indicate that chronic TNFα exposure is sufficient to alter RPE morphology and impede cardinal features that define the differentiated state of RPE cells with striking similarities to RPE alterations with age and dysfunctions observed in AMD.

Methods

RPE cell-cultures

Isolation of primary porcine RPE cells was conducted according to a previously described protocol [20]. This procedure adheres to the European initiative for restricting animal experimentation because not a single animal was killed for our experimentation specifically. Briefly, porcine eyes were purchased from a local slaughterhouse (Guy Harang, Houdan, France) in agreement with the local regulatory department and veterinarians and transported in CO₂-independent medium (Thermo Fisher Scientific) 2 or 3 h after enucleation. Eyes were dissected and cleaned off surrounding conjunctiva, tenon's capsule, and muscles then immersed (2 × 5 minutes) in an antiseptic solution (Pursept-A Xpress, Merz Hygiene GmbH). The anterior segment of the bulb including the lens, vitreous gel, and the retina were then removed to isolate an eye-cup made of sclera, choroidal, and RPE cells. Each eye cup was washed twice with PBS (Thermo Fisher Scientific) and incubated with 0.25% trypsin–EDTA (Thermo Fisher Scientific) for

75 min at 37 °C. Trypsin-detached RPE cells were pipetted off the choroid and resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific) supplemented with decomplexed 20% fetal calf serum (FCS, Thermo Fisher Scientific) and 1% penicillin/streptomycin (PS) (final concentrations 100 U/ml and 100 µg/ml) antibiotic mixture. Purified cells were seeded in 60-mm Petri dishes in DMEM-FCS20%-PS1% and incubated in a 5% CO₂ regulated atmosphere at 37 °C. The culture DMEM-FCS20%-PS1% medium was changed after 24 h. When the cells reached a 70–80% confluence state (usually at day 4), 0.05% trypsin–EDTA was added for 5 min at 37 °C. The cells were then seeded on either 96-well culture plates (Corning) at the concentration of 75,000 cells/well or in 6.5 mm trans-well polyester filters (0.4 µm pore size, Corning, Kennebunk, ME, USA) at a concentration of 100,000 cells/well in DMEM-FCS20%-PS1%. Visual confluence was obtained after 2 weeks in culture at 37 °C, 5% CO₂, and cells were used immediately for TNFα treatment.

Human blood monocyte isolation and supernatant preparation

Human blood from healthy donors was collected for monocyte isolation after written informed consent in the Centre National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts (Paris). The protocol was approved by the *Direction Générale pour la Recherche et l'Innovation* of the *Ministère de l'Enseignement et de la Recherche* (Dossier n°14.007) and by the *Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés* (N/Ref.: IFP/MKE/AR144088). Briefly, peripheral blood mononuclear cells were obtained by Ficoll gradient centrifugation of fresh human blood, washed three times with PBS, and negatively sorted using the EasyStep Human Monocyte Enrichment Cocktail without CD16 Depletion kit (StemCell Technologies).

Lipopolysaccharide (LPS, O127:B8)-stimulated monocyte (Mo) supernatant was produced by a 2-h stimulation of freshly prepared Mo, followed by a 24 culture of 100,000 Mo in 0.1 ml of fresh DMEM containing 1% penicillin/streptomycin (without LPS). The SN were then stored at – 80 °C until use in RPE cultures.

Culture protocols and cell treatments

RPE monoculture

RPE cells were kept in culture until confluence then serum starved the day before starting supernatant (SN), TNFα and/or anti TGFβ treatments, in order to minimize the effects of serum on culture outcomes. In supernatant experiments, Mo SN was added daily for a maximum duration of 10 days. In TNFα experiments, recombinant TNFα (from R&D) was added daily in 1%FCS-1%PS DMEM at various concentrations: 0.8, 4, or 20 ng/ml for 10 days. In inhibition experiments, anti-TGFβ (Sigma, ref. SB505124, 500 nM) was added daily

and simultaneously with TNF α (in 1%FCS-1%PS DMEM), for 10 days. At the end of culture, cells were washed twice with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 min. Alternatively, RA1 buffer was added to the cells to perform real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR).

RPE-monocyte coculture

To evaluate the possible changes in their immunosuppressive capacity, RPE cells were pretreated during 10 days in 1%FCS-1%PS DMEM +/- different concentrations of recombinant TNF α before adding freshly purified human monocytes. For coculture purposes, RPE cells were serum and TNF α starved the day before adding 100,000 monocytes to RPE cells in each well. Cells were incubated at 37 °C for a total of 24 h.

Immunofluorescence microscopy

At the end of culture, cells were fixed in 4% PFA for 10 min then washed twice in PBS and incubated for 2 min in a permeabilizing solution (0.1% triton- 0.1% sodium citrate in PBS). Cells were then blocked for 1 h in PBS-0.1% triton-5% horse serum (Thermo Fisher Scientific) and incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: polyclonal goat anti-human OTX2, 1/500, R&D; monoclonal rat anti-mouse Zonula Occludens(ZO)-1, 1/200, Millipore and rabbit anti-human hematopoietic transcription factor PU-1, 1/200 diluted in PBS triton 0.1% and 1% horse serum. Alexa fluor 594 phalloidin (Invitrogen) was used for F-actin staining. Secondary antibodies produced in donkey were used at room temperature for 1 h (AlexaFluor 488 nm and 647 nm, 1/500, Thermo Fisher Scientific), and nuclei were counterstained with Hoechst (1/1000, Sigma-Aldrich). Cells were washed twice in PBS and observed under fluorescence microscope (Arrayscan VTI HCS Reader, Thermo Fisher Scientific). Twenty-five fields per well were analyzed and recorded using the Arrayscan software (HCS iDev Cell Analysis Software, Thermo Fisher Scientific).

Measurement of transepithelial resistance

Transepithelial resistance of RPE cells grown on transwell inserts was measured daily using a WPI EVOM (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) device. All measurements were performed in the cell culture hood within 5 min of removal from the incubator. For TER measurement purposes, the measuring probe was immersed beforehand in 100% ethanol for 15 min then incubated in culture medium for two additional hours. Net TER was obtained by subtracting the value of a transwell filter without cells from that of cell-containing filters. The TER per unit area (Ω cm²) was obtained by multiplying the raw TER value by the

surface of transwell inserts (0.33 cm²). Before the start of TNF α or anti-TGF β treatments, the polarization of RPE cells was determined and confirmed by their high TER (> 250 Ω cm²). All measurements were expressed as percentage of control.

Phagocytosis assay

RPE phagocytosis of porcine photoreceptor outer segments (POS) was evaluated according to a previously described protocol [21]. RPE cells were pre-treated in 1%FCS-1%PS DMEM in presence of different concentrations of TNF α for 10 days then serum starved 24 h before evaluating their POS phagocytic capacity (exposure to POS: 3 h).

Western blot analysis

Rhodopsin degradation was analyzed qualitatively in a Western blot (WB) assay. Briefly, RPE cells were previously cultured in 1%FCS-1%PS DMEM, with or without different concentrations of TNF α for 10 days, then serum starved before adding the POS (according to a previously described protocol [21]) for 6 and 24 h respectively. After these incubation periods, supernatants were removed and RIPA buffer was added to RPE cells before performing the WB as previously described [22] using primary anti-Rhodopsin (Merck ref MAB5316) and anti- β -actin antibodies (Sigma).

Proliferation assay

DNA replication in RPE cells was assessed in vitro using the Click-it EDU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) Alexa Fluor 594 Imaging kit according to the manufacturer's instructions after fixating the cells in 4% PFA for 10 min and preparing them for immunofluorescence microscopy using primary and secondary antibodies as described earlier.

Cell-fusion study

Freshly collected porcine RPE cells were incubated for 20 min at 37 °C in presence of either 5 μ M CFSE or 1 μ M Far red CFSE (cell trace, cell proliferation kits, Invitrogen) according to the manufacturer's protocol then kept for 5 min in 20%FCS 1%PS DMEM and centrifuged at 800 rpm for five additional minutes. The cells were then seeded in 16-well glass slide lab-tek (Nunc) at the final concentration of 75,000 cells per well in DMEM-FCS20%-PS1% (including 50% CFSE labeled and 50% Far red CFSE labeled cells). When confluence was reached, cells were serum starved and treated daily with either DMEM-PS1% or TNF α -enriched medium as previously described.

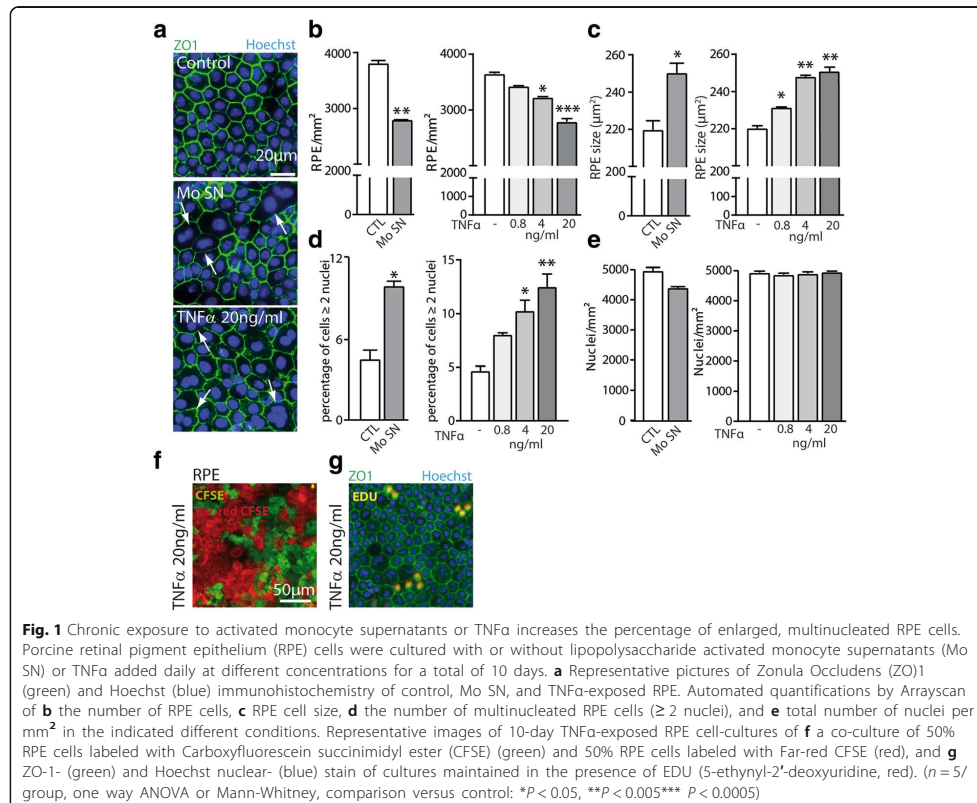
Reverse transcription and real-time quantitative polymerase chain reaction

Total RNA from cell cultures was extracted using the Nucleospin RNAII extraction kit according to the manufacturer's protocol (Macherey Nagel). RNA yields were then measured using the NanoDrop™ 8000 spectrophotometer at a 260 nm wavelength. Overall, RNA concentrations ranged between 40 and 80 ng/μL. Reverse transcription into single-strand cDNA was performed using 1 μg of total mRNA (pretreated with DNase), oligo-dT, and superscript II reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific). For real-time PCR, 1/50 of cDNA was incubated with the polymerase and appropriate amounts of nucleotides (PowerSYBR Green PCR mix, Applied Biosystems) and PCR was performed using StepOne Plus real-time PCR system (Applied Biosystems). Results were normalized using house-keeping gene RPS26. PCRs were performed in 45 cycles of 15 s at 95 °C, 45 s at 60 °C. Primers for RT-PCR were purchased from IDT technology. Sequences are as follows: ACTA2 forward 5'-CCAACCGGGAGAAGATGACC- 3'; ACTA 2

reverse 5'- AGAGTCCAGCACAATGCCAG- 3'; CLD19 forward 5'-GCCCTAGCACACCTGTCAAT -3'; CLD19 reverse 5'- ACGTGCAGCAGAGGAACGAG-3'; OCLD forward 5'-ATTTATGACGAGCAGCCCCC-3'; OCLD reverse 5'-GCATAGTCCGAAAGGGGAGG-3'; RPE65 forward 5'- TTCTCTTTTCAGGGCCTCGT-3'; RPE65 reverse 5'- AAAGATGGGTTCGGATGGGT-3'; RPS26 forward 5'-TCGATGCCTATGTGCTTCCC-3'; RPS26 reverse 5'-CAGCACCCGCAGGTCTAAAT-3'; TGFβ1 forward: TTACAACAGTACCCGCGACC; TGFβ1 reverse: CCGCTTTCCAGCATTAGCAC; TTR forward 5'- TGGA AGGCACTTGGCATTTC-3'; TTR reverse 5'- GGTGGA GTAAGAGTAGGGGC -3'.

Statistical analyses

Graph Pad Prism 7 (GraphPad Software) was used for data analysis and graphic representation. All values are reported as mean ± SEM. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA analysis of variance, Student *t* test or Mann–Whitney test for comparison of mean



values when applicable, followed by Bonferroni post-test. The *p* values are indicated in the figure legends.

Results

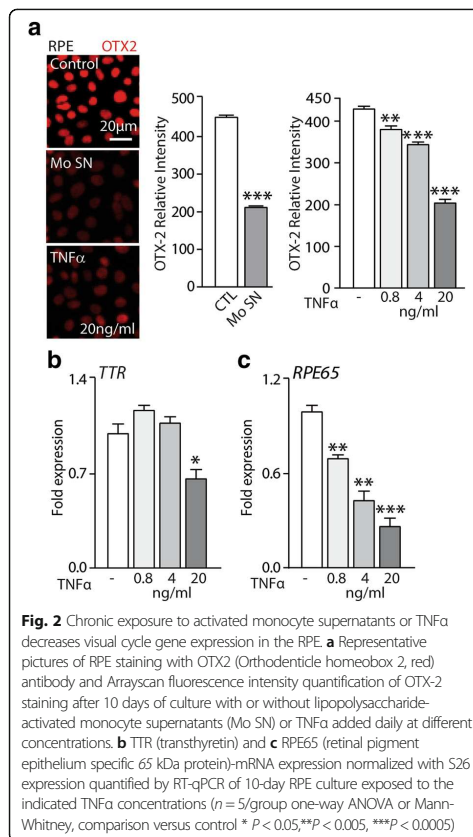
Chronic exposure to activated monocyte supernatants or TNF α increases the percentage of enlarged, multinucleated RPE cells

In vitro, confluent primary porcine RPE cells form a mosaic of hexagonal and regularly shaped cells with tight junctions that can be visualized by a Zonula Occludens 1 (ZO1) immunohistochemistry (Fig. 1a). Ten daily repeated exposures to lipopolysaccharide (LPS)-stimulated Mo supernatant (Mo SN) or daily exogenously added TNF α did not induce RPE cell monolayer defects but led to enlarged and irregularly shaped RPE cells (Fig. 1a). Automated quantification of the number of ZO1-demarcated RPE cells using an Arrayscan revealed that Mo SN exposure decreased the cell number (Fig. 1b) in parallel to an increase of average RPE cell size (Fig. 1c). TNF α stimulation was sufficient to induce a similar effect in a dose-dependent manner (Fig. 1b, c). The increase in RPE cell size was associated with a significant increase of the percentage of polynucleated cells in both conditions (Fig. 1a arrows and Fig. 1d) that led to a complete compensation of the overall density of nuclei per surface (Fig. 1e). Ten-day culture of 50% CFSE-stained and 50% CFSE far red-stained RPE cells showed no red/green double-labeled cells in TNF α -exposed cell-cultures, excluding cell fusion as a mechanism of polynucleation in this condition (Fig. 1f). Addition and revelation of the traceable nucleotide 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EDU) to the TNF α -exposed cell-cultures showed that nuclei of multinucleated RPE cells were EDU positive (Fig. 1g), demonstrating that polynucleation was due to nuclei replication and failed cytokinesis as previously shown in aged mice in vivo [3].

In conclusion, 10-day exposure to Mo SN or TNF α alone provided a sufficient stimulus to induce an increase in the percentage of enlarged, multinucleated RPE cells similar to what is observed in vivo with age [3, 4].

Chronic TNF α decreases visual cycle gene expression in the RPE

Transthyretin (TTR), a retinol carrier, and RPE65 that is responsible for the conversion of all-trans-retinyl esters to 11-cis-retinol are strongly expressed by the RPE and essential parts of the visual cycle. We have previously shown that TNF α acutely reduces the expression of TTR and orthodenticle homeobox 2 (OTX2) that regulates its expression [22]. Here, repeated stimulation of primary RPE by TNF α diminished the intensity of OTX2-staining measured with an Arrayscan similar to 10 repeated Mo SN exposures (Fig. 2a). Chronic TNF α exposure also significantly reduced TTR transcription, measured by RT-qPCR, at higher concentrations (Fig. 2b). Additionally, we noticed a dose-dependent decrease of RPE65 transcription (Fig. 2c).



In summary, we demonstrated that chronic exposure to Mo SN and TNF α downregulated the expression of major RPE visual cycle genes.

Chronic exposure to TNF α disrupts RPE barrier properties

Physiologically, individual RPE cells are joined by tight junctions (TJ) to form an ion-impermeable epithelium that constitutes the outer blood-retinal barrier from the fenestrated vessels of the choroid. In vitro, this RPE function is reflected by a high transepithelial electrical resistance (TER) [23]. Repeated TNF α exposure of confluent primary RPE cells grown in trans-wells significantly diminished the TER in a dose- and time-dependent manner starting at day 3 (Fig. 3a). Immunohistochemistry of 10-day TNF α -exposed RPE cells using ZO1 antibody and phalloidin that binds to F actin filaments showed a loss of the preferential location to cell borders of both proteins in the 4 and 20 ng/ml groups (Fig. 3b). Both groups also displayed a

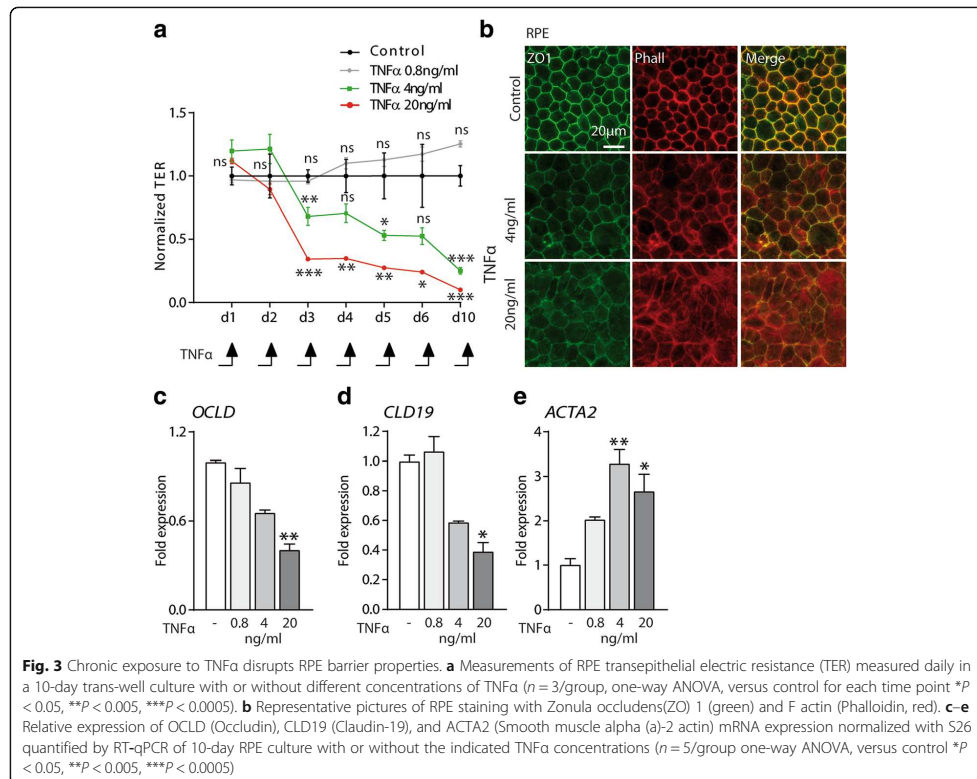


Fig. 3 Chronic exposure to TNFα disrupts RPE barrier properties. **a** Measurements of RPE transepithelial electric resistance (TER) measured daily in a 10-day trans-well culture with or without different concentrations of TNFα ($n = 3/\text{group}$, one-way ANOVA, versus control for each time point $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.005$, $^{***}P < 0.0005$). **b** Representative pictures of RPE staining with Zonula occludens (ZO) 1 (green) and F actin (Phalloidin, red). **c–e** Relative expression of OCLD (Occludin), CLD19 (Claudin-19), and ACTA2 (Smooth muscle alpha (a)-2 actin) mRNA expression normalized with S26 quantified by RT-qPCR of 10-day RPE culture with or without the indicated TNFα concentrations ($n = 5/\text{group}$ one-way ANOVA, versus control $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.005$, $^{***}P < 0.0005$)

significantly inhibited transcription of TJ components occludin and claudin19 by RT-qPCR at day 10 (Fig. 3c, d). On the contrary, repeated exposure to even 0.8 ng/ml of TNFα increased the transcription of smooth muscle alpha (a)-2 actin (ACTA2), a major constituent of the contractile fibers that are classically expressed in myofibroblasts and smooth muscle cells (Fig. 3e).

Taken together, our data shows that repeated exposure to TNFα induces profound changes in cytoskeleton and TJ component expression and leads to the loss of the physiological TER that characterizes primary RPE cells.

Chronic exposure to TNFα does not alter the phagocytosis and degradation of rod outer segments

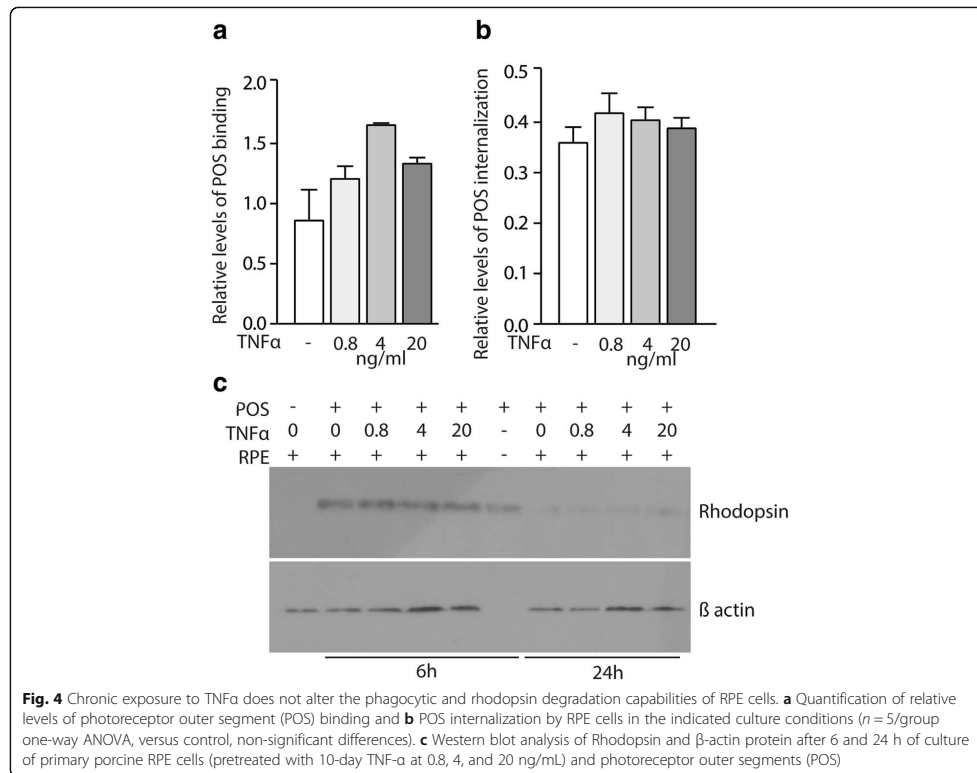
Phagocytosis of shed photoreceptor outer segments (POS) and recycling is another important role of RPE cells. To examine the effects of chronic TNFα exposure on RPE phagocytic function, we incubated FITC-labeled POS with control and 10-day TNFα pre-treated RPE cells as previously described [21]. After 3 h of incubation with POS, we noted a

tendency to increased POS binding by RPE cells (Fig. 4a), but no difference in the amount of internalized POS between the groups (Fig. 4b). Furthermore, Western blots of rhodopsin of the same protein amount from control and TNFα pre-treated RPE cells, exposed to POS for 6 and 24 h, clearly demonstrated POS degradation after 24 h in both control and TNFα pre-treated cells (Fig. 4c). If normalized to actin β levels, which increased dose dependently with TNFα levels, rhodopsin remnants at 24 h in TNFα pre-treated cells would seem to be even lower than in the control group (Fig. 4c).

Together, these experiments suggest that chronic TNFα exposure does not impede the RPE's capacity to phagocytize and digest POS.

Chronic exposure to TNFα impairs the immunosuppressive RPE cell function

The subretinal space is an immunosuppressive environment, mediated in part by immunosuppressive signals of the RPE [2]. In vitro, we have recently shown that



primary RPE cells rapidly induce the elimination of non-activated monocytes (Mo) in a cell-contact dependent manner [22]. To test whether chronic TNF α exposure altered the RPE's capacity to eliminate Mo, we incubated equal numbers of peripheral blood Mo with control and 10-day TNF α pre-treated RPE cells for 24 h and stained the co-culture with an anti-PU1-antibody that specifically recognizes Mo, which express this transcription factor, contrary to RPE cells (Fig. 5a). Arrayscan quantification of the number of PU1⁺Mo demonstrates up to a 500% increase in Mo numbers in the co-culture conditions, where the RPE was pre-incubated repeatedly with TNF α (Fig. 5b).

Taken together, our data demonstrates that chronic exposure of RPE to TNF α severely diminishes its immunosuppressive capacities.

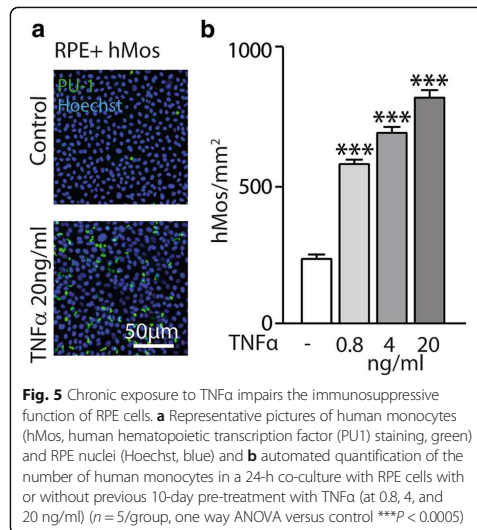
TNF α -induced TGF- β expression mediates the RPE polynucleation and impairment of barrier properties

TNF α induces the expression and DNA binding of AP-1 (activator protein-1) resulting in increased transcription of

the TGF- β 1 gene in lung fibroblasts [24]. Furthermore, TGF- β 1 has been shown to mediate fibrosis in the lung and to induce RPE dedifferentiation in the context of retinal detachment and proliferative vitreoretinopathy [25].

RT-qPCR analysis showed that repeated TNF α exposure induced a strong increase of TGF β 1 transcription at 2 days that remained increased after 10 days of culture (Fig. 6a). Interestingly, the co-administration of TGF β -receptor inhibitor (500 nM) to the RPE culture inhibited the TNF α -induced polynucleation described in Fig. 1 (Fig. 6b). Similarly, TGF β -receptor inhibitor prevented the TNF α -induced dislocation of the RPE junction protein ZO1 and F-actin (Fig. 6c) and partially restored the TER (Fig. 6d). On the other hand, the inhibition of TGF β signaling did not prevent the TNF α -induced decrease in OTX2 expression (data not shown).

Taken together, these data strongly suggest that some, but not all, of the TNF α -induced RPE dysfunction is mediated by increased TGF- β signaling that has previously been shown to perturb certain RPE functions.



Discussion

We and others previously showed that M ϕ s accumulate on the apical side of the RPE adjacent to atrophic zones that define GA, around choroidal neovascularizations and around large drusen in intermediate AMD [2, 8–12, 26]. The RPE is therefore likely chronically exposed to M ϕ -derived cytokines that might alter its function. One of the key cytokines of potential interest is TNF α , which increases with age in plasma and M ϕ s [14, 15, 17, 18] and is increased in CFH AMD-risk variant carriers [16]. We recently demonstrated that M ϕ -derived TNF- α acutely downregulates the transcription factor orthodenticle homeobox 2 (OTX2) that is constitutively expressed in RPE cells, where it regulates a number of essential RPE genes [22] and TNF- α exposure has been shown to acutely diminish RPE barrier functions [23]. We here exposed primary RPE cells to 10 daily repeated TNF α stimulations to mimic the exposure of in vivo chronic inflammatory conditions and evaluated its impact on RPE morphology and its main distinctive functions: visual cycle gene expression, tight-junction organization and transepithelial resistance, POS phagocytosis and ROS degradation, and its immunosuppressive capacities. We exposed the RPE to a range of TNF α concentrations from 0.8 to 20 ng/ml, which we administered daily, as TNF α has been reported to have a short half-life of around 15 min [27] and compared some of the findings to the exposure of supernatants from 24 h LPS-activated monocytes (Mo SN).

First, using ZO1/nuclear Hoechst immunohistochemistry, we observed that after 10 days of exposure to Mo SN, the RPE remained confluent. However, the number

of RPE cells had decreased significantly, which was compensated by an increased, albeit irregularly shaped, cell-size. In parallel, the percentage of polynucleated cells was significantly increased compared to controls. TNF α exposure was sufficient to induce very similar morphological differences in a dose-dependent manner. TNF α exposure of cultures using a mixture of red- and green-labeled RPE cells and EdU incorporation assays also revealed that the polynucleated cells were not the result of cell fusion but the consequence of nucleic replication in the polynucleated cells. Interestingly, the nucleic replication exactly compensated for the cells lost during the 10-day TNF α and Mo SN exposure, suggesting that the number of nuclei per RPE was finely regulated by their cell size. Interestingly a similar mechanism is also observed in vivo with age [3] that is associated with increased TNF α levels [14, 15, 17, 18] and in the vicinity of large drusen [5]. Although these differences were observed in the 0.8 ng/ml, and 4 ng/ml group, they were most prominent in the 20 ng/ml group and similar to Mo SN exposure.

We next evaluated if chronic TNF α exposure influenced the expression of visual cycle genes. We have previously shown that TNF α acutely downregulates the expression of the transcription factor OTX2 that regulates a number of RPE-specific genes, notably TTR that is involved in the visual cycle [22]. Similarly, chronic TNF α exposure inhibited OTX2 expression, alike to Mo SN exposure, evaluated by immunohistochemistry and fluorescence quantification. It not only diminished the transcription of TTR but also induced a strong and dose dependent reduction in the expression of RPE65 that is not controlled by OTX2. Our observations in primary RPE cells thereby reproduce similar findings in an RPE cell line [28]. Together these results confirm our previous findings and suggest that chronic TNF α exposure reduces the expression of several RPE-specific genes that are implicated in the visual cycle. Dysfunction of the visual cycle leads to an increase of recovery time in the scotopic ERG after bleach, as it takes more time to reproduce 11-cis-retinal. Interestingly, patients with large drusen that are associated with polynucleated RPE cells [5] also present a marked increase in recovery time after bleach [6, 7], which could be due to exposure to TNF α secreted by the associated chronic infiltrate.

Physiologically, individual RPE cells are joint by TJs and the confluent RPE forms an ion-impermeable epithelium that constitutes the outer blood-retinal barrier from the fenestrated vessels of the choroid. We here show that repeated TNF- α exposure of primary RPE induces a dose-dependent loss of the TER, a functional measure of its barrier function, at 4 ng/ml and 20 ng/ml, that worsens with each TNF- α application. Both, 4 ng/ml and 20 ng/ml TNF- α -exposed RPE cells also displayed a loss of the

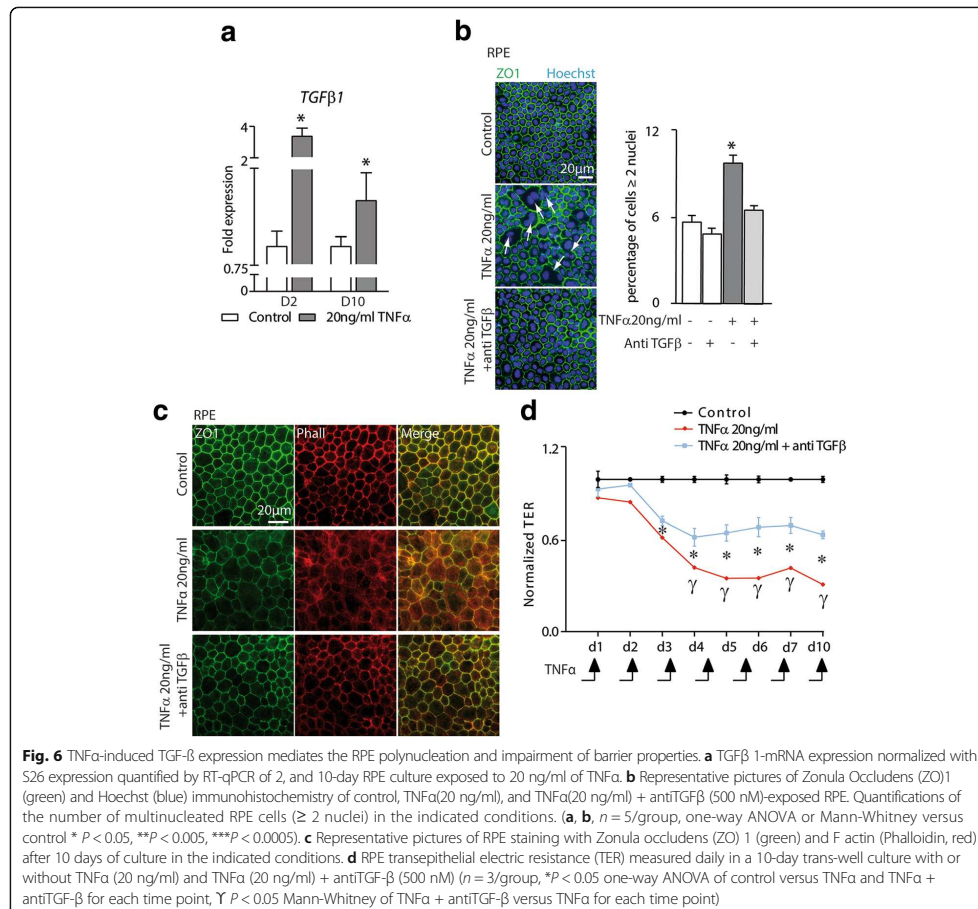


Fig. 6 TNFα-induced TGF-β expression mediates the RPE polynucleation and impairment of barrier properties. **a** TGFβ1 mRNA expression normalized with S26 expression quantified by RT-qPCR of 2, and 10-day RPE culture exposed to 20 ng/ml of TNFα. **b** Representative pictures of Zonula Occludens (ZO)1 (green) and Hoechst (blue) immunohistochemistry of control, TNFα(20 ng/ml), and TNFα(20 ng/ml) + antiTGFβ (500 nM)-exposed RPE. Quantifications of the number of multinucleated RPE cells (≥ 2 nuclei) in the indicated conditions. (**a, b**, $n = 5$ /group, one-way ANOVA or Mann-Whitney versus control * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$). **c** Representative pictures of RPE staining with Zonula occludens (ZO) 1 (green) and F actin (Phalloidin, red) after 10 days of culture in the indicated conditions. **d** RPE transepithelial electric resistance (TER) measured daily in a 10-day trans-well culture with or without TNFα (20 ng/ml) and TNFα (20 ng/ml) + antiTGF-β (500 nM) ($n = 3$ /group, * $P < 0.05$ one-way ANOVA of control versus TNFα and TNFα + antiTGF-β for each time point, γ $P < 0.05$ Mann-Whitney of TNFα + antiTGF-β versus TNFα for each time point)

preferential location of the TJ protein ZO1 and F actin filaments to cell borders, diminished transcription of the TJ components occludin and claudin19, and increased expression of smooth muscle alpha (α)-2 actin (ACTA2), in accordance with altered barrier functions. A similar decrease of TER has previously been described after 24 h of a single stimulation with TNF- α at 10 to 50 ng/ml [23], which was not observed after a stimulation with 100 pg/ml [29]. Taken together, our data and the data from the literature suggest that exposure to TNF- α , and in particular repeated exposure, severely impedes RPE barrier functions.

We next evaluated if chronic TNFα-exposure affected the RPE's capacity to phagocyte and digest POS, an important function for their recycling and renewal.

Interestingly, the phagocytosis assay revealed a tendency of increased POS binding, little differences in POS uptake, and no differences in rhodopsin degradation, the major protein of POS. These results suggest that chronic TNFα exposure has little influence on RPE phagocytosis, contrary to the other examined functions.

Last but not least, we examined the immunosuppressive capacity of TNFα pre-exposed RPE by incubating the cells with monocytes after their 10-day cytokine exposure. While monocytes were quickly eliminated by the contact with control RPE for 24 h, as previously described [22], we observed a very significant dose-dependent increase in monocyte survival of the co-culture in TNFα-exposed RPE, suggesting that their capacity to induce monocyte death was severely reduced.

TNF α induces the expression and DNA binding of AP-1 resulting in increased transcription of the TGF- β 1 gene in lung fibroblasts [24]. Our results show that it similarly induces TGF- β 1 in RPE cells. Interestingly, pharmacological inhibition of TGF- β signaling prevented the TNF α -induced increase in polynucleated RPE cells and reduced the decline of the TER but did not restore OTX2 expression levels. These results suggest that some, but not all, of the TNF α -induced effects are mediated by TGF- β 1.

Conclusions

Taken together our results indicate that chronic TNF α exposure is sufficient to alter RPE morphology and impede three out of four cardinal features that define the differentiated RPE. These alterations bare striking similarities to RPE alterations with age and dysfunctions observed in AMD, which are associated with macrophage infiltration [2] and likely chronic TNF α exposure [14–19]. Our results therefore suggest that strategies inhibiting TNF α signaling in RPE cells might help preserve its essential functions and slow degeneration in late AMD.

Abbreviations

Mp: Macrophage; ACTA2: Smooth muscle alpha (a)-2 actin; AMD: Age-related macular degeneration; CFH: Complement factor H; CFSE: Carboxyfluorescein succinimidyl ester; CLD19: Claudin 19; CNV: Choroidal neovascularization; DMEM: Dulbecco Modified Eagle Medium; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid; EDU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine; ERG: Electroretinogram; FCS: Fetal calf serum; GA: Geographic atrophy; Mo: Monocyte; OCLD: Occludin; OTX2: Orthodenticle homeobox 2; PBS: Phosphate buffered saline; PFA: Paraformaldehyde; POS: Photoreceptor outer segment; PS: Penicillin streptomycin; qPCR: Quantitative polymerase chain reaction; ROS: Rod outer segments; RPE: Retinal pigment epithelium; RPE65: Retinal pigment epithelium specific 65 kDa protein; RT: Reverse transcription; TER: Trans-epithelial resistance; TGF β : Transforming growth factor beta; TJ: Tight junction; TNF α : Tumor necrosis factor alpha; TTR: Transthyretin; ZO1: Zonula occludens 1

Acknowledgements

We wish to thank A. Potey and M. Lechuga from the high-throughput screening platform, supported by Department de Paris and by Region Ile de France, and Olivier Goureau and Tristan Bodier for invaluable intellectual and technical assistance.

Funding

This work was supported by grants from INSERM, ANR Geno 2009 (R09099DS), ANR MACLEAR (ANR-15-CE14-0015-01), LABEX LIFESENSES (ANR-10-LABX-65) supported by the ANR (Investissements d'Avenir programme [ANR-11-IDEX-0004-02]), and a generous donation by Doris and Michael Bunte.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article. The datasets used and/or analyzed during the current study are also available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

ST made substantial contributions to acquisition of data, analysis and interpretation of data; drafted the manuscript; gave final approval of the version to be published; and agreed to be accountable for all aspects of the work. FB, SA, HCM, LV, EFN, SR, VF, TM, JS, BB, and XG made substantial contributions to analysis and interpretation of data; revised the manuscript critically for important intellectual content; gave final approval of the version to be published; and agreed to be accountable for all aspects of the work. FS made substantial contributions to conception and design, analysis and interpretation of data; drafted the manuscript; gave final approval of the version to be published; and agreed to be accountable for all aspects of the work.

Ethics approval and consent to participate

The protocol for human blood sampling and monocyte preparation was approved by the *Direction Générale pour la Recherche et l'Innovation* of the *Ministère de l'Enseignement et de la Recherche* (Dossier n°14.007) and by the *Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés* (N/Ref: IFP/MKE/AR144088).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, 17 rue Moreau, F-75012 Paris, France. ²Department of Ophthalmology, Reference Center in Rare diseases, DHU Sight Restore, Hôpital Pitié Salpêtrière, University Paris VI, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. ³CHNO des Quinze-Vingts, DHU Sight Restore, INSERM-DGOS CIC 1423, 28 rue de Charenton, F-75012 Paris, France.

Received: 13 September 2017 Accepted: 25 February 2018

Published online: 16 March 2018

References

1. Strauss O. The retinal pigment epithelium. *Physiol Rev.* 2005;85:845–81.
2. Guillonnet X, Eandi CM, Paques M, Sahel J-A, Sapiéha P, Sennlaub F. On phagocytes and macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 2017;61:98–128.
3. Chen M, Rajapakse D, Fraczek M, Luo C, Forrester JV, Xu H. Retinal pigment epithelial cell multinucleation in the aging eye—a mechanism to repair damage and maintain homeostasis. *Aging Cell.* 2016;15:436–45.
4. Starnes AC, Huisinigh C, McGwin G, Sloan KR, Ablonczy Z, Smith RT, et al. Multinucleate retinal pigment epithelium cells of the human macula exhibit a characteristic and highly specific distribution. *Vis Neurosci.* 2016;33:e001.
5. Al-Hussaini H, Schneiders M, Lundh P, Jeffery G. Drusen are associated with local and distant disruptions to human retinal pigment epithelium cells. *Exp Eye Res.* 2009;88:610–2.
6. Flamendorf J, Agrón E, Wong WT, Thompson D, Wiley HE, Doss EL, et al. Impairments in dark adaptation are associated with age-related macular degeneration severity and reticular pseudodrusen. *Ophthalmology.* 2015; 122:2053–62.
7. Owsley C, Jackson GR, Cideciyan AV, Huang Y, Fine SL, Ho AC, et al. Psychophysical evidence for rod vulnerability in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:267–73.
8. Combadière C, Feumi C, Raoul W, Keller N, Rodéro M, Pézard A, et al. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J Clin Invest.* 2007; 117:2920–8.
9. Lad EM, Cousins SW, Van Arnam JS, Proia AD. Abundance of infiltrating CD163+ cells in the retina of postmortem eyes with dry and neovascular age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2015; 253:1941–5.
10. Levy O, Calippe B, Lavalette S, Hu SJ, Raoul W, Dominguez E, et al. Apolipoprotein E promotes subretinal mononuclear phagocyte survival and chronic inflammation in age-related macular degeneration. *EMBO Mol Med.* 2015;7:211–26.
11. Sennlaub F, Auvynet C, Calippe B, Lavalette S, Poupel L, Hu SJ, et al. 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.* 2013;5:1775–93.
12. Gupta N, Brown KE, Milam AH. Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res.* 2003;76:463–71.
13. Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: from mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants—past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014;25:453–72.

14. Bruunsgaard H, Skinhøj P, Pedersen AN, Schroll M, Pedersen BK. Ageing, tumour necrosis factor- α (TNF- α) and atherosclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2000;121:255–60.
15. Paolisso G, Rizzo MR, Mazziotti G, Tagliamonte MR, Gambardella A, Rotondi M, et al. Advancing age and insulin resistance: role of plasma tumor necrosis factor- α . *Am J Phys*. 1998;275:E294–9.
16. Cao S, Ko A, Partanen M, Pakzad-Vaezi K, Merkur AB, Albani DA, et al. Relationship between systemic cytokines and complement factor H Y402H polymorphism in patients with dry age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2013;156:1176–83.
17. Agrawal A, Agrawal S, Cao J-N, Su H, Osann K, Gupta S. Altered innate immune functioning of dendritic cells in elderly humans: a role of phosphoinositide 3-kinase-signaling pathway. *J Immunol*. 2007;178:6912–22.
18. Alvarez-Rodríguez L, López-Hoyos M, Muñoz-Cacho P, Martínez-Taboada VM. Aging is associated with circulating cytokine dysregulation. *Cell Immunol*. 2012;273:124–32.
19. Cousins SW, Espinosa-Heidmann DG, Csaky KG. Monocyte activation in patients with age-related macular degeneration: a biomarker of risk for choroidal neovascularization? *Arch Ophthalmol*. 2004;122:1013–8.
20. Arnault E, Barrau C, Nanteau C, Gondouin P, Bigot K, Viénot F, et al. Phototoxic action spectrum on a retinal pigment epithelium model of age-related macular degeneration exposed to sunlight normalized conditions. *PLoS One*. 2013;8:e71398.
21. Law A-L, Parinot C, Chatagnon J, Gravez B, Sahel J-A, Bhattacharya SS, et al. Cleavage of Mer tyrosine kinase (MerTK) from the cell surface contributes to the regulation of retinal phagocytosis. *J Biol Chem*. 2015;290:4941–52.
22. Mathis T, Housset M, Eandi C, Beguier F, Touhami S, Reichman S, et al. Activated monocytes resist elimination by retinal pigment epithelium and downregulate their OTX2 expression via TNF- α . *Aging Cell*. 2017;16:173–82.
23. Shirasawa M, Sonoda S, Terasaki H, Arimura N, Otsuka H, Yamashita T, et al. TNF- α disrupts morphologic and functional barrier properties of polarized retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res*. 2013;110:59–69.
24. Sullivan DE, Ferris M, Nguyen H, Abboud E, Brody AR. TNF- α induces TGF- β 1 expression in lung fibroblasts at the transcriptional level via AP-1 activation. *J Cell Mol Med*. 2009;13:1866–76.
25. Saika S, Kono-Saika S, Tanaka T, Yamanaka O, Ohnishi Y, Sato M, et al. Smad3 is required for dedifferentiation of retinal pigment epithelium following retinal detachment in mice. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. 2004;84:1245–58.
26. Eandi CM, Charles Messance H, Augustin S, Dominguez E, Lavalette S, Forster V, et al. Subretinal mononuclear phagocytes induce cone segment loss via IL-1 β . *elife*. 2016;5. <https://doi.org/10.7554/eLife.16490>.
27. Moritz T, Niederle N, Baumann J, May D, Kurschel E, Osieka R, et al. Phase I study of recombinant human tumor necrosis factor alpha in advanced malignant disease. *Cancer Immunol Immunother Cll*. 1989;29:144–50.
28. Kutty RK, Samuel W, Boyce K, Cherukuri A, Duncan T, Jaworski C, et al. Proinflammatory cytokines decrease the expression of genes critical for RPE function. *Mol Vis*. 2016;22:1156–68.
29. Zech JC, Pouvreau I, Cotinet A, Goureau O, Le Varlet B, de Kozak Y. Effect of cytokines and nitric oxide on tight junctions in cultured rat retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:1600–8.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



2.2 Effet de la L-DOPA sur l'inflammation sous rétinienne (Expérimentations non publiées)

2.2.1 Introduction

La dopamine a montré un effet modulateur sur la réponse immunitaire avec selon les circonstances une action pro- ou anti-inflammatoire [469]. Alors que le rôle de ce neurotransmetteur a beaucoup été étudié au niveau rétinien sur la modulation du signal visuel, aucune recherche n'a spécifiquement été menée sur son rôle dans le l'homéostasie anti-inflammatoire de l'espace sous rétinien.

A l'aide de notre modèle de co-culture, nous avons étudié la survie des Mos au contact de l'EPR, ainsi que les altérations induites par leur présence sur l'EPR. Nous avons ensuite utilisé des modèles murins reproduisant les mécanismes de recrutement inflammatoire sous rétinien dans la DMLA.

2.2.2 Méthodes

2.2.2.1 Expérimentations *in vitro* : modèle de co-culture EPR – Monocytes

Les conditions de co-cultures ont été précédemment validées et nous avons utilisé des méthodes similaires pour évaluer ces effets [58]. Ainsi, de l'EPR de porc ensemencé 3 jours avant à une concentration de 75.000 cellules par puits ont été mis en co-culture avec 100.000 Mos humains fraîchement purifiés. Les puits de co-culture ont ensuite été traités par PBS (puits contrôle), benserazide, L-DOPA +/- benserazide et LPS. Après 24 ou 48h de coculture, le nombre de Mos était comptabilisé après fixation par un immunomarquage PU1, et le nombre de cellules d'EPR par un immunomarquage OTX-2

2.2.2.2 Expérimentations *in vivo*

Modèle d'illumination rétinienne

Ce modèle, précédemment décrit, permet de mettre en évidence un éventuel recrutement accru de PMs dans des conditions pro-inflammatoires telles que celles rencontrées dans la DMLA [50,51,55]. Nous avons utilisé des souris âgées de 2 à 4 mois, adaptées à l'obscurité pendant 6h avant d'être soumises à une exposition à une lumière verte intense (4500 lx) sous dilatation

pupillaire pendant 4 jours. Les rétines et les choroïdes de souris sont ensuite prélevées et immunomarquées avec IBA-1, permettant la détection des PMs sous rétinien.

Modèle de néovascularisation choroïdienne induite par laser

Ce modèle, couramment utilisé pour explorer l'angiogenèse choroïdienne, permet aussi de mettre en évidence le recrutement précoce des PMs aux abords de la membrane néovasculaire [55,79]. Après avoir effectué 4 impacts laser par rétine de souris de 8 semaines préalablement prétraitées pendant 7 jours, les rétines et choroïdes étaient immunomarquées par IBA-1 pour analyser le recrutement inflammatoire sur le pourtour des membranes néovasculaires identifiées par un immunomarquage Col-IV et CD-102.

2.2.2.3 Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé par un test non paramétrique de Mann-Whitney lorsque 2 groupes étaient comparés, ou par un test ANOVA suivi d'une analyse de Bonferroni lorsque le nombre de groupes était supérieur à 2. Un $p < 0.05$ était considéré comme significatif.

2.2.3 Résultats

2.2.3.1 Effet sur le modèle de co-culture EPR – Monocytes *in vitro*

Nous avons voulu investiguer le rôle de la L-DOPA et de l'inhibiteur de la DDC (benserazide) sur la survie des Mos dans notre modèle de co-culture, ainsi que sur les altérations entraînées sur l'EPR de porc.

L'ajout de benserazide 10 μ M ou de L-DOPA à différentes concentrations (1, 10 et 100 μ M) pendant 24h ou 48h ne modifie pas la survie des Mos sur l'EPR, au contraire du LPS comme précédemment montré [58]. De la même manière, l'ajout de ces traitements ne modifie pas le nombre de cellules d'EPR, ni l'intensité de fluorescence du facteur de transcription OTX-2 exprimé dans le noyau de ces cellules. Seule une concentration de L-DOPA à 1 mM entraîne une mort cellulaire, que ce soit des Mos ou de l'EPR (**Figure 39**). Le traitement de la co-culture par l'association de L-DOPA et benserazide à ces mêmes concentrations ne modifie pas non

plus la survie des Mos et de l'EPR. De la même manière, le traitement isolé avant la co-culture des Mos ou des cellules d'EPR, ne modifie pas les résultats pour tous les groupes. Il est à noter que les cultures d'EPR de porc expriment la DDC, permettant ainsi la conversion de la L-DOPA en dopamine.

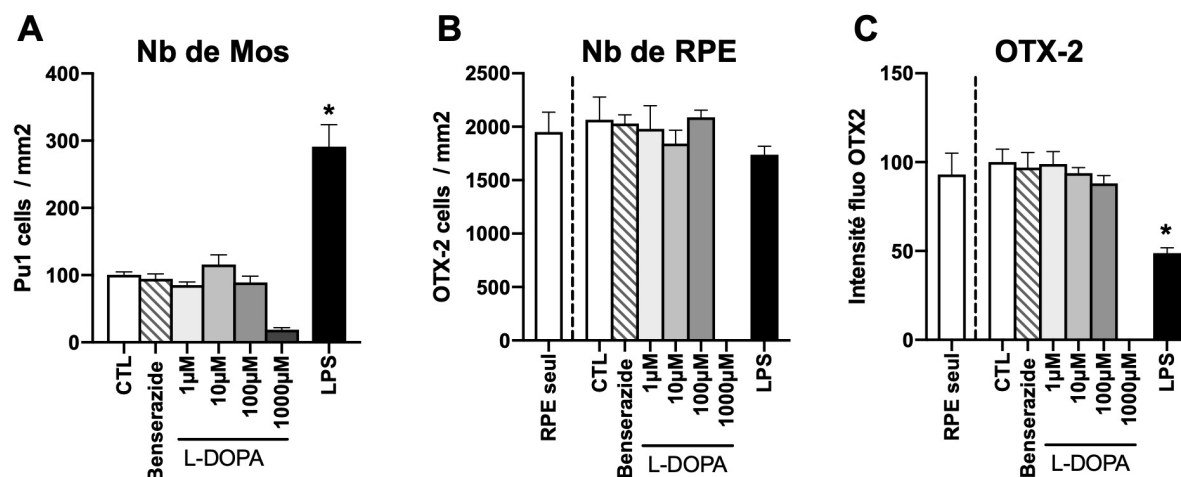


Figure 39 : Co-culture associant monocytes et EPR traités par différentes concentrations de L-DOPA en comparaison avec un traitement par LPS. A. Comptage des monocytes après marquage par PU1 (one-way ANOVA/Bonferroni test : LPS versus chaque autre groupe $*P<0.0001$) ; B. Comptage des cellules d'EPR après marquage d'OTX-2 ; C. Intensité de fluorescence du marquage OTX-2 des cellules d'EPR (one-way ANOVA/Bonferroni test : LPS versus chaque autre groupe $*P<0.0001$).

2.2.3.2 Effet sur un modèle *in vivo* d'illumination prolongée

Pour tenter de mettre en évidence un éventuel effet pro- ou anti-inflammatoire de la L-DOPA et/ou de l'inhibiteur de la DDC périphérique, nous avons soumis à une illumination pendant 4 jours des souris de type *wild type*, mais aussi des souris *CX3CR1^{-/-}*. Cette souche de souris est connue pour entraîner une inflammation sous rétinienne plus importante dans les modèles induits de DMLA [50,51,79].

Après 4 jours d'illuminations, nous n'avons pas mis en évidence de différence entre les groupes contrôles et traités (par benserazide seul, ou par l'association L-DOPA/benserazide) sur les souris pro-inflammatoires *CX3CR1^{-/-}*. Ce résultat suggère que ni la L-DOPA, ni le benserazide ne diminuent le recrutement de PMs dans l'espace sous rétinien des animaux soumis à ce stress lumineux. De la même manière, en utilisant des souris *wild type*, aucun des traitements n'a montré d'augmentation de l'inflammation sous rétinienne en fin d'illumination (**Figure 40**).

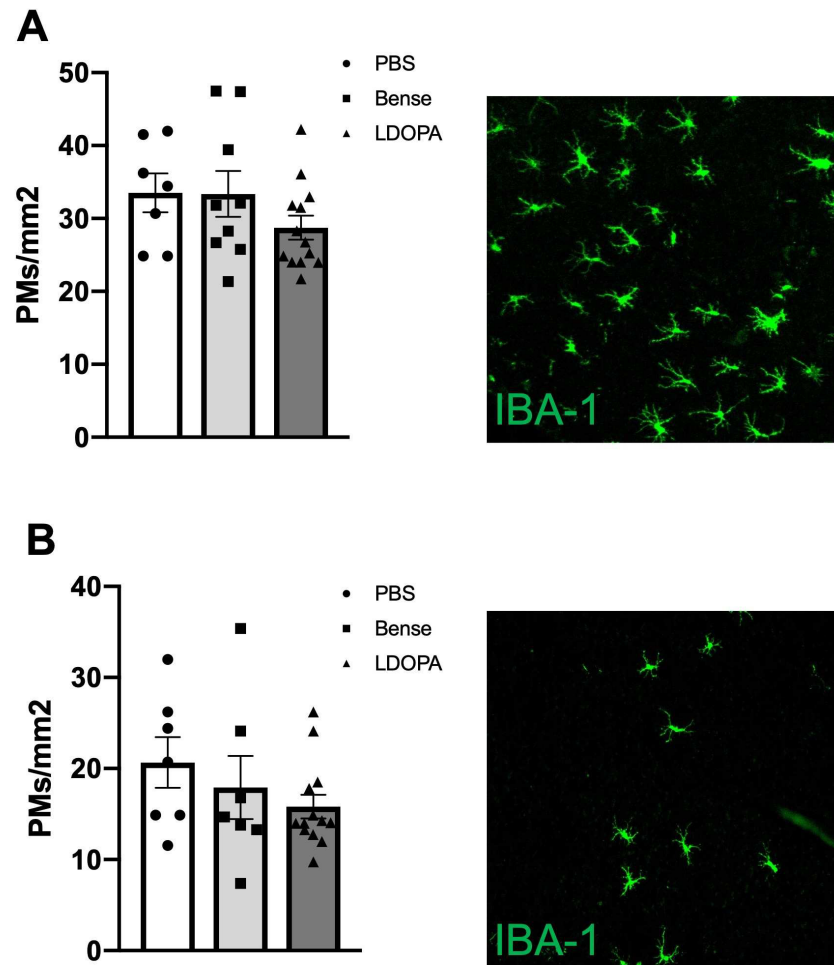


Figure 40 : Modèle d'inflammation sous rétinienne induite par une illumination de 4 jours. Des souris pro-inflammatoire $CX3CR1^{-/-}$ (A) et *wild type* (B) ont été illuminées pendant 4 jours. Les choroïdes et les rétines ont ensuite été montées à plat et marquées par IBA-1, un anticorps spécifique reconnaissant les phagocytes mononuclés. Le nombre de cellules inflammatoires a ensuite été compté sur chaque couple rétine/choroïde. Pour chacune des 2 expérimentations, aucune différence significative n'a été retrouvée entre les groupes (one-way ANOVA/Bonferroni : non significatif pour les 2 expérimentations).

2.2.3.3 Effet de la L-DOPA sur l'inflammation dans un modèle *in vivo* de néovascularisation choroïdienne

La néovascularisation choroïdienne est accompagnée d'un recrutement inflammatoire, comme en atteste la mise en évidence de PMs dans et au pourtour des membranes néovasculaires [54,79,502,506]. Nous avons donc utilisé un modèle de NVC induits par photocoagulation laser chez des souris intoxiquées ou non au MPTP, reproduisant ainsi la perte en neurones

dopaminergiques centraux de la maladie de Parkinson [394,516]. Ces souris étaient ensuite traitées ou non par L-DOPA et benserazide. Nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives du recrutement de ces PMs dans l'espace sous rétinien autour des membranes néovasculaires 4, 7 et 10 jours après l'induction par laser sur les souris intoxiquées au MPTP. De la même manière, il n'y avait pas de différences de recrutement de cellules inflammatoires selon le groupe de traitement de la souris (**cf. partie 2.1**).

2.2.4 Conclusion

En conclusion, l'utilisation de modèles reproduisant l'inflammation dans le cadre d'une DMLA (qu'il s'agisse d'un modèle murin de la maladie de Parkinson, ou de l'utilisation d'un traitement par L-DOPA et/ou benserazide sur des souris présentant un NVC induit ou un recrutement inflammatoire suite à une illumination), n'a pas permis de mettre en évidence une modification de la réponse inflammatoire dans l'espace sous rétinien, au contact de l'EPR.

III- EXPLORATION DE L'ANGIOGENESE (ARTICLE 3)

3.1 La L-DOPA inhibe l'angiogenèse choroïdienne de manière indépendante

Afin d'explorer séparément les effets de la maladie de Parkinson et de son traitement par la L-DOPA, nous avons utilisé un modèle de néovascularisation choroïdienne suite à un traumatisme par laser (**Figure 41**). Ces expérimentations ont été réalisées sur des souris *wild type* ou sur des modèles intoxiqués au MPTP. Ces modèles ont ensuite subi des traitements différents : PBS, un inhibiteur de la DDC (benserazide), ou l'association de L-DOPA avec la benserazide. L'ensemble des expérimentations a permis de démontrer que seuls les groupes traités par L-DOPA entraînaient une diminution de la réponse néovasculaire choroïdienne, indépendamment du groupe intoxiqué au MPTP. Cette réduction de l'angiogenèse était retrouvée à tous les temps (4, 7 et 10 jours) avec un maximum à 7 jours. D'autre part, nous n'avons pas retrouvé de modifications du recrutement des cellules inflammatoires entre les groupes.

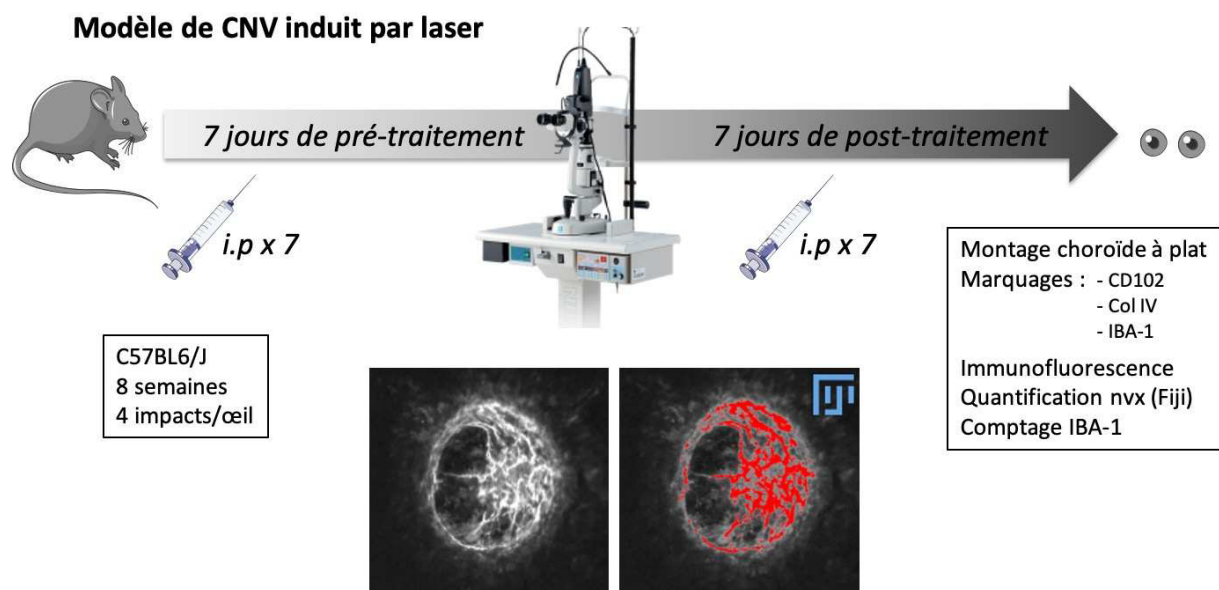


Figure 41 : Modèle d'induction d'une néovascularisation par laser chez les souris. Ici, les animaux sont traités pendant 7 jours avant le laser puis 7 jours après le laser (Schéma T.Mathis).

Tous ces résultats montrent que seul un traitement combiné associant L-DOPA et benserazide, inhibe le développement des néovaisseaux sous rétiniens. Les résultats montrent également que les effets de la maladie de Parkinson ne permettent pas d'inhiber le développement de néovaisseaux. De plus, le nombre de PMs recrutés n'est pas altéré par le modèle de Parkinson

au MPTP, ni par le traitement par L-DOPA, au contraire de ce qui a pu être montré au niveau cérébral [439,499].

3.2 La décarboxylation de la L-DOPA est nécessaire pour inhiber l'angiogenèse

Nos résultats *in vivo* démontrent que c'est la combinaison de L-DOPA avec benserazide, et non la benserazide seule, qui exerçait un effet inhibiteur sur la formation néovasculaire choroïdienne, sans affecter l'infiltration inflammatoire. Cette inhibition *in vivo* pourrait ainsi être médiée par la L-DOPA, ou par la dopamine, qui est aussi augmentée avec le traitement systémique chez des patients atteints par la maladie de Parkinson [497].

Dans un modèle *ex vivo* d'explants choroïdiens, la L-DOPA et la dopamine inhibent fortement le bourgeonnement vasculaire entre J3 et J6, en comparaison aux explants non traités (**Figure 42**). Par contre, lorsque ces explants étaient traités par le benserazide quelques minutes avant la L-DOPA, l'effet anti-angiogénique retrouvé avec la L-DOPA seule était fortement diminué. Ainsi, la conversion de la L-DOPA en dopamine semble nécessaire à une action anti-angiogénique. En accord avec ce résultat retrouvé sur les explants choroïdiens, nous avons aussi montré que la dopamine, et non la L-DOPA inhibait la prolifération de HCECs induite par le VEGF.

Modèle de culture d'explant choroïdien

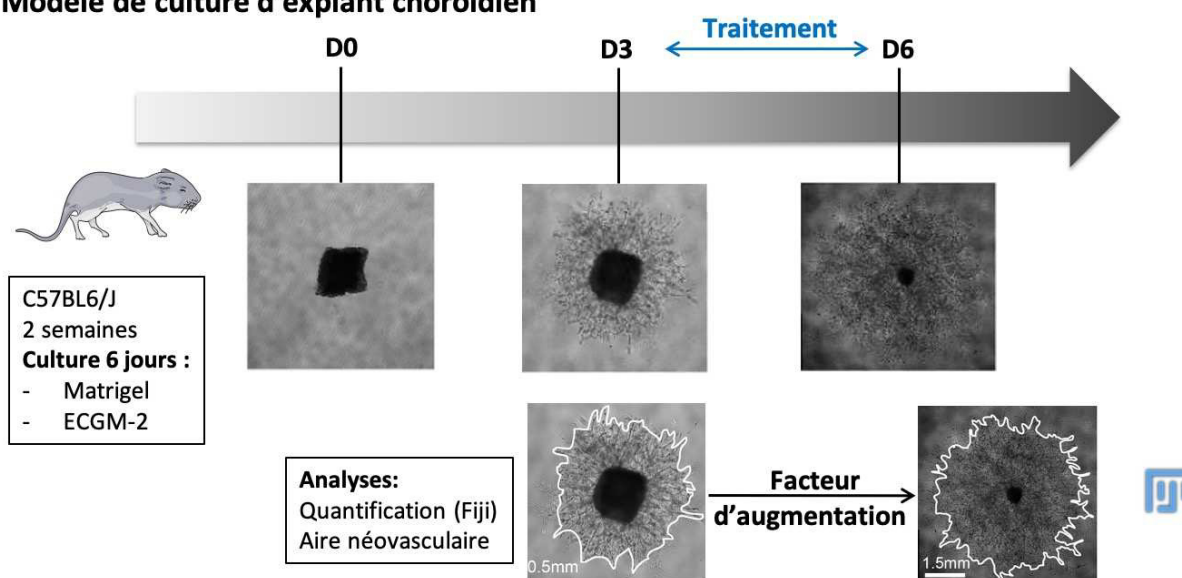


Figure 42 : Modèle d'explant choroïdien. Les choroïdes de souris sont prélevées et le bourgeonnement vasculaire va se créer librement les 3 premiers jours. A partir de J3, celles-ci sont traitées selon les conditions choisies et le facteur d'augmentation de cette prolifération entre J3 et J6 est comparé entre les groupes de traitement (Schéma T.Mathis).

L'ensemble de ces résultats montre ainsi que c'est la dopamine, et non la L-DOPA qui permet une inhibition de la prolifération vasculaire choroïdienne.

3.3 L'activation du récepteur D2 est nécessaire pour inhiber l'angiogenèse choroïdienne

La dopamine peut agir via 5 types de récepteurs répartis en 2 sous-familles : D1-like (D1 et D5) et D2-like (D2, D3, D4) [235]. Tous les récepteurs à la dopamine sauf D3 ont été retrouvés dans la rétine et l'EPR [517–519]. Par contre, seule l'expression de D2 a été retrouvée augmentée dans les choroïdes de souris qui ont été traitées par laser pour induire une néovascularisation. Sur le modèle d'explants choroïdiens, seul l'eticlopride, un antagoniste D2 permet de renverser l'effet anti-angiogénique de la dopamine. De plus, l'agoniste spécifique du récepteur D2, le quinpirole, a la même action que la dopamine, au contraire des agonistes des autres récepteurs dopaminergiques. Enfin, le quinpirole seul est suffisant pour induire la même inhibition que la L-DOPA associée au benserazide sur le modèle de néovascularisation induite par laser chez des souris, et l'eticlopride renverse entièrement l'effet de la L-DOPA.

L'ensemble de nos données suggère ainsi que l'effet anti-angiogénique de la dopamine passe par l'activation du récepteur D2.

ARTICLE 3 : Le traitement des patients atteints de la maladie de Parkinson par L-DOPA inhibe la néovascularisation choroïdienne dans la DMLA via l'activation du récepteur dopaminergique D2

L-DOPA treatment of Parkinson patients inhibits choroidal neovascularization in age related macular degeneration through dopamine D2 receptor activation

Thibaud Mathis^{1,2,3}, Florian Baudin⁴, Sébastien Augustin¹, Marion Bricout^{1,2,3}, Christophe Roubeix¹, Anne-Sophie Mariet⁴, Guillaume Blot¹, Lucile Vignaud¹, Caroline Nous¹, Laurent Kodjikian^{2,3}, Martine Mauget-Faÿsse⁵, José-Alain Sahel^{1,5,6}, Xavier Guillonnet¹, Cécile Delarasse¹, Catherine Creuzot-Garcher⁴, Stéphane Hunot⁷, Florian Sennlaub^{1†}

¹Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, 17 rue Moreau, F-75012 Paris, France.

²Hopital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, 103 grande rue de la Croix-rousse 69004 Lyon, France

³UMR-CNRS 5510, Matéis, Université Lyon 1, Campus de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

⁴Department of Ophthalmology, Dijon University Hospital, Dijon, France

⁵Fondation Ophtalmologique Adolphe de Rothschild, 29 rue Manin, F75019 Paris, France

⁶Department of Ophthalmology, University of Pittsburgh school of Medicine, Pittsburgh, PA 15213, United States

⁷Inserm UMRS 1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Université, Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière (ICM), F-75013, Paris, France

†Correspondence should be addressed to the lead contact: Dr Florian Sennlaub, Inserm, UMR_S 968, Institut de la Vision, Paris, F-75012, France. Tel: (33) 1 53 46 26 93,

Email: florian.sennlaub@inserm.fr.

Summary

Neovascular age-related macular degeneration (nAMD) remains a major cause of visual impairment, despite the continuous repeated intravitreal administration of anti-VEGF therapies that puts a considerable burden on patients, ophthalmologists and health care systems. A retrospective cohort of several million of patients in US found that L-DOPA treated parkinsons disease (PD) patients have a significantly delayed age of onset for nAMD. Using MPTP-induced PD- and laser-induced nAMD- mouse models in combination with the standard PD treatment of L-DOPA / DOPA-decarboxylase inhibitor, we here demonstrate that an L-DOPA treatment-induced increase of dopamine receptor 2 (DR2) signaling, and not the PD itself, is likely responsible for the inhibition of choroidal neovascularization. While explaining an intriguing epidemiological observation, our findings show that systemic DR2 agonists might constitute a much sought after therapy to reduce the need for anti-VEGF therapy in nAMD patients.

Introduction

Alongside Alzheimer's disease, Parkinson's disease (PD) and Age-related macular degeneration (AMD) are the most common neurodegenerative diseases (de Lau & Breteler 2006; Colijn et al. 2017).

AMD is the leading cause of central vision loss in the elderly (Wong et al. 2014; Klein et al. 2004). There are two debilitating late forms of the disease: Geographic atrophy (GA), characterized by an extending lesion of the retinal pigment epithelium (RPE) and the photoreceptor cell layer, and neovascular AMD (nAMD), defined by leaky choroidal neovascularisation (CNV) that, untreated, leads to retinal edema, hemorrhage and fibrosis (Sarks 1976; Guillonnet et al. 2017). The vascular endothelial growth factor (VEGF) is a critical mediator of the sight-threatening neovascular complication that defines nAMD (D'Amore 1994) and its inhibition by monthly to bi-monthly intravitreal anti-VEGF therapies have reduced the risk of legal blindness in patients by 50% (Bloch et al. 2012). However, the continuous need for repeated intravitreal administration of anti-VEGF therapies puts a considerable burden on patients, ophthalmologists and health care systems (Rofagha et al. 2013; Baek et al. 2019).

PD is characterized by a progressive loss of dopaminergic neurons (Hirsch et al. 2013; Olanow & Tatton 1999). Their loss in the central nervous system (CNS) induces bradykinesia, resting tremor, postural imbalance and a multitude of non-motor symptoms. Initially, PD is often treated with synthetic dopamine agonists, but most PD patients will eventually be treated with a combination of L-DOPA, a metabolic precursor of dopamine, and a DOPA-decarboxylase inhibitor (DDI) (Rascol et al. 2000). Unlike dopamine, 5-10% of L-DOPA can cross the blood-brain barrier where a DOPA-decarboxylase converts it into dopamine, alleviating its pathological low levels. To reduce L-DOPAs peripheral conversion into

dopamine, and achieve high L-DOPA/dopamine concentrations in the CNS, it is invariably administered in combination with a peripheral DOPA-decarboxylase inhibitor (DDI) that does not cross the blood-brain barrier (Tambasco et al. 2018). Despite the administration of DDI a significant amount of the peripheral L-DOPA is converted to dopamine increasing the plasma dopamine levels by 50-250%, which is responsible for the most common peripheral side-effects (nausea, vomiting, orthostatic hypotension) (Dutton et al. 1993; Schneider et al. 2018; Ceballos-Baumann et al. 1990).

Several epidemiological studies, have recently shown that patients treated for nAMD significantly increases the incidence of PD (Chung et al. 2014; Etminan et al. 2018; Choi et al. 2020). This link could be due to the repeated anti-VEGF therapy, or to common risk factors (such as the apolipoprotein epsilon 2 variant (McKay et al. 2011) and common neurodegenerative mechanisms (Huang et al. 2004)).

On the other hand one study of retrospective cohorts in large prescription and diagnostic patient databases revealed that patients that were prescribed L-DOPA, were protected against AMD and in particular nAMD (Brilliant et al. 2016). The authors had previously shown that L-DOPA inhibits the release of VEGF from RPE mono-cultures, via the orphan receptor GPR143 (Lopez et al. 2008; Falk et al. 2012) and proposed that a similar mechanism is responsible for the epidemiological observation. However, L-DOPA treatment is invariably administered with a DDI, concomitantly leads to an increase in peripheral dopamine (Ceballos-Baumann et al. 1990) and the vast majority of L-DOPA treated patients also have PD. In the *in vivo* situation in patients, any of these L-DOPA treatment-associated factors might be responsible for the observed delay and decrease in nAMD incidence.

Using L-DOPA, DDI, dopamine- agonist and antagonist on (i) *in vivo* MPTP-induced PD- and laser-induced nAMD- mouse models, (ii) *ex vivo* choroidal explants, and (iii) *in vitro*

human choroidal endothelial cell cultures, we here investigated the possible underlying mechanisms. Our data demonstrates that MPTP-induced loss of dopaminergic neurons does not directly affect laser-induced CNV, but that the L-DOPA treatment-induced increase of dopamine receptor 2 (DR2) signaling very significantly reduces the neovascularization. While explaining an intriguing epidemiological observation, our findings strongly suggest that systemic DR2 agonists might constitute a much sought after therapy to reduce the need for anti-VEGF therapy in nAMD patients.

Results

L-DOPA/decarboxylase inhibitor treatment prevents choroidal neovascularisation independently of subretinal inflammation and the loss of dopaminergic neurons in mice

Delayed diagnosis and decreased treatment frequency of nAMD in patients treated by L-DOPA can be due to L-DOPA, the co-administered DDI, or the underlying disease, which for the vast majority of cases in our retrospective cohorts is PD. To differentiate, whether the loss of dopaminergic neurons or its therapy influences choroidal neovascularization (CNV), we submitted C57BL/6/J mice to four intraperitoneal (i.p) injections of either a control saline solution or 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine hydrochloride (MPTP-HCl; 20 mg/kg) at 2-h intervals. This MPTP-intoxication protocol reproducibly induces the loss of at least 50% of the dopaminergic neurons of the substantia nigra evidenced on tyrosine hydroxylase immunostained brain sections (Fig. 1A), mimicking the pathognomic change underlying PD (Przedborski et al. 2001; Lundblad et al. 2005; Duty & Jenner 2011; Jackson-Lewis & Przedborski 2007). After one week, half of the MPTP-mice were treated by daily intraperitoneal PBS, while the other half were injected with L-DOPA and Benserazide, a commonly used DDI (30mg/Kg and 12mg/kg respectively), in exact analogy to therapeutic regimens of PD. Following a week of treatment, the mice underwent subretinal laser-injury, which induces subretinal inflammation and choroidal neovascularization and is commonly used as a model of nAMD (Lavalette et al. 2011; Guillonnet et al. 2017). RPE/ choroidal flatmounts stained for IBA-1+ mononuclear phagocytes (MPs, green) and CD102+vascular endothelial cells (red, Fig. 1A), prepared after an additional seven days of continued treatment, demonstrated that the number of subretinal infiltrating MPs, a driving force of CNV development (Guillonnet et al. 2017), was not affected by either the MPTP-induced

The decarboxylation of L-DOPA to dopamine is necessary for the anti-angiogenic effect on CNV *ex-vivo* and *in vitro*

Our *in vivo* results demonstrate that the PD treatment of L-DOPA and Benserazide, but not Benserazide alone, exerts an inhibitory effect on CNV formation, without affecting MP infiltration. The inhibition of CNV *in vivo* could therefore be mediated by L-DOPA, or through Dopamine, which is increased with systemic L-DOPA/Benserazide treatment of PD patients, as Benserazide only partially prevents the conversion of the high therapeutic doses of L-DOPA to dopamine by the DOPA-decarboxylase (DDC) *in vivo* (by 50-250% in patients (Ceballos-Baumann et al. 1990), and up to 200% in animal models (Rose et al. 1988), likely due to only partial DDC inhibition in peripheral dopaminergic neurons.

In the eye DDC mRNA, detected by Rt-qPCR, was detected in the retina, but also in freshly prepared mouse RPE, and in the RPE/choroid, where it is additionally expressed in sympathetic neurons and mast cells to produce adrenaline and histamine respectively (Fig. 2A). It was also expressed in fresh human RPE (Fig. 2B), in accordance with previous reports of mRNA and protein expression of DDC in the RPE (Ming et al. 2009). In contrast, DDC mRNA was undetectable in human choroidal endothelial cells (HCECs), compared to the expression in the RPE (Fig. 2B). Interestingly, dopamine and L-DOPA significantly inhibited vascular sprouting from choroidal explants compared to controls, when administered from day 3 to day 6 as previously described (Shao et al. 2013; Montassar et al. 2017) (Fig. 2C). Quantifications of the sprouting area, expressed as the increase of sprouting area between 3 and 6 days, revealed a significant inhibition by Dopamine and L-DOPA at 1 μ M, while Benserazide alone had no significant effect (Fig. 2D). However, when we administered Benserazide, the inhibitor of the DDC that converts L-DOPA to Dopamine, at 10 μ M prior to the L-DOPA stimulation, the anti-angiogenic effect of L-DOPA in the choroidal explants was much attenuated (Fig. 2D). These results suggested that preincubation with 10 μ M

Benserazide achieved a near complete DDC inhibition and diminished dopamine production in the explants. Indeed, dopamine in turn dose-dependently inhibited vascular sprouting (Fig. 2E). In accordance with the results from the choroidal explants that suggested that L-DOPA had to be converted to dopamine for its anti-angiogenic effect, dopamine, but not L-DOPA, inhibited the *in vitro* VEGF-induced proliferation of HCECs (Fig. 2E and F), as the HCEC lack the DDC.

Taken together, our data showed that dopamine prevents VEGF-induced HCEC proliferation *in vitro* and dose dependently inhibits CNV *ex vivo*. L-DOPA need to be converted to dopamine to have a similar effect, as it had no effect on HCEC proliferation that lack the DDC, and its effect in choroidal explants was inhibited when the DDC was pharmacologically inactivated.

Dopamine receptor 2 activation mediates the CNV inhibition observed under L-DOPA / decarboxylase inhibitor treatment *in vivo*

Dopamine mediates its biological effects through 2 subfamilies of G protein-coupled dopamine receptors: DR1 and DR5 (D1-like), and DR2, DR3 and DR4 (D2-like) (Neve et al. 2004). All dopamine receptors, except DR3, are expressed in the retina and the RPE. These receptors mediate the dopamine-regulated processes from neurotransmission (DR1-like and DR2-like), circadian cycle (DR2/DR4), phagocytosis (DR1), to the regulation of eye growth (balance of DR1-like and DR2-like activation) to name but a few (Nguyen-Legros et al. 1999; Witkovsky 2004; Ko 2020; Zhou et al. 2017; Feldkaemper & Schaeffel 2013). Beyond the eye, dopamine receptors are expressed on tumor immune cells and endothelial cells (Basu et al. 2001; Sarkar et al. 2004; Chakroborty et al. 2004), but their expression and function in CNV is unknown.

Rt-PCR analysis of mRNA extracts of retina and choroid of control and seven day laser-injured mice confirmed that all dopamine receptors except DR3 (not detected) were present in retina and choroid (Figure 3A) as previously reported (Derouiche & Asan 1999; Jackson et al. 2009; Nguyen-Legros et al. 1999). DR2 mRNA in the RPE/choroid was the only transcript induced by laser-injury, while its expression in the retina and all other DRs remained stable (Figure 3B). DR2 was also detectable in both, mRNA extracted from fresh human RPE cells (where it can stem from RPE expression but also ingested rod outer segments) and HCECs, the two major cell types of RPE/choroidal preparations (Fig. 3C). Functionally, the specific DR2-antagonist Eticlopride completely reversed the anti-angiogenic effect of dopamine on the vascular outgrowth of RPE/choroidal explants (Fig. 3D and E). Moreover, the activation of DR2 with the specific DR2 agonist Quinpirole was sufficient to achieve a comparable anti-angiogenic effect than dopamine, but activation of DR1 and 5 (SKF38393) or DR4 (PD168077) had no such effect (Fig. 3E). *In vivo*, the DR2-antagonist Eticlopride also entirely reversed the L-DOPA/DDI-induced inhibition of CD102⁺CNV, quantified on IBA1 / CD102 double labeled RPE/choroidal flatmounts of seven-day laser-injured mice (Fig. 3F-H). Most-importantly, the DR2 agonist Quinpirole achieved a comparable anti-angiogenic effect than the L-DOPA/DDI treatment (Fig 3G) and none of the administered DR agonists and antagonists significantly altered the number of infiltrating IBA1⁺MPs (Fig. 3H)

Taken together, our data show that blocking the DR2 receptor prevents the anti-angiogenic effect of dopamine *ex vivo* and the L-DOPA/DDI treatment *in vivo*, demonstrating that L-DOPA/DDI treatment's anti-angiogenic effect necessitates the activation of DR2. Importantly, we show that DR2 activation is sufficient to produce a similar therapeutic response.

PD model, or the L-DOPA / Benserazide treatment (Fig. 1B). However, quantification of the surface covered by CD102⁺CNV revealed that L-DOPA / Benserazide treatment but not the MPTP-induced loss of dopaminergic neurons induced a significant inhibition of the CNV development (Fig. 1C). This result suggested that L-DOPA / Benserazide treatment and not the underlying MPTP-induced pathology induces a reduction in CNV development. Indeed, when we evaluated subretinal IBA1⁺MP infiltration (Fig. 1D and 1E) and CD102⁺CNV development (Fig. 1F and G) in wildtype mice without MPTP intoxication, CNV was significantly inhibited in mice having been pre-treated for seven days and until sacrifice with L-DOPA/Benserazide. This was the case at d4 after laser injury (maximal MP infiltration), d7 (maximal CNV development), and d10 (during CNV involution (Lavalette et al. 2011)) (Fig. 1E and 1G). In fact, there were no statistical differences between 4, 7 and 10 days in CNV area for mice treated by L-DOPA/Benserazide, while there were a significant difference between 4 and 7 days and between 7 and 10 days for mice treated by PBS. The MP infiltration was not altered by the treatment at any point. Importantly, the inhibitory effect was only observed in mice treated with L-DOPA and Benserazide and not in mice treated with the DDI only.

Taken together, these experiments show that the combined treatment of L-DOPA and Benserazide, but not the MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons, nor the inhibition of the DOPA-decarboxylase inhibits subretinal CNV development. Interestingly, the number of infiltrating MPs was not altered by either the PD model or the treatment at any time point analyzed, in contrast of the known proinflammatory effect of the MPTP-intoxication and L-DOPA treatment in the brain (Troncoso-Escudero et al. 2018; Hirsch & Hunot 2009).

Discussion

An analysis of retrospective cohorts in large prescription and diagnostic patient databases revealed that patients that were prescribed L-DOPA, in their majority PD patients, were somewhat protected against AMD and in particular nAMD (Brilliant et al. 2016). Although many patients were included in this epidemiological study, it does not allow determining whether L-DOPA treatment or PD- induced changes prevented the development of nAMD.

In mice, CNV formation can be induced by a laser-injury (Lavalette et al. 2011) and MPTP intoxication induces the loss of dopaminergic neurons, mimicking the pathognomic change underlying PD (Przedborski et al. 2001; Lundblad et al. 2005; Duty & Jenner 2011; Jackson-Lewis & Przedborski 2007). Our experiments showed that MPTP intoxication and the loss of dopaminergic neurons of the substantia nigra did not alter a subsequent laser-induced subretinal inflammatory reaction or CNV formation. However, when we treated the MPTP-mice with the combination of L-DOPA and DOPA-decarboxylase inhibitor (DDI), in an exact analogy with PD patients, the CNV, but not the number of infiltrating MPs, was significantly inhibited. These results suggested that the PD treatment, and not the loss of central dopaminergic neurons, very significantly inhibited CNV formation. Indeed, when mice without MPTP-intoxication were treated with the combinational therapy of L-DOPA/DDI we found the subretinal angiogenesis, but not the MP infiltration, to be similarly inhibited. The DDI alone had no such effect.

L-DOPA is converted to dopamine by the aromatic L-amino acid decarboxylase, which is commonly called the DOPA decarboxylase (DDC) despite the fact that it has a variety of other substrates and is involved in the synthesis of other neurotransmitters and neuromodulators as well as the production of Histamine (Sanchez-Jiménez et al. 2016). Unlike Dopamine, 5-10% of L-DOPA can cross the blood-brain barrier where a DOPA-

decarboxylase converts it into dopamine, alleviating its pathological low levels. In PD the L-DOPA treatment is invariably accompanied by a peripheral DOPA-decarboxylase inhibitor (DDI) (Tambasco et al. 2018) that decreases the conversion to CNS-impenetrable dopamine in the periphery. In PD, the DDI keeps the peripheral L-DOPA concentrations high and favors L-DOPA penetration to the CNS. However, despite the administration of DDI a significant amount of the high dose therapeutically administered L-DOPA is converted to dopamine increasing the plasma dopamine levels by 50-250%, which is responsible for the most common peripheral side-effects (nausea, vomiting, orthostatic hypotension) (Rose et al. 1988; Dutton et al. 1993; Schneider et al. 2018; Ceballos-Baumann et al. 1990).

In our model, the inhibitory effect of the L-DOPA/DDI treatment could therefore be directly due to L-DOPA or to dopamine, that could either be increased due to retinal dopamine conversion of L-DOPA to dopamine, observed in treated PD patients (Harnois & Di Paolo 1990), to increased choroidal conversion or the above described increase in plasma levels. In RPE/choroidal explants, L-DOPA only inhibited vascular sprouting when the DDC, which we confirm is expressed in the RPE/choroid (Ming et al. 2009), was not inhibited. These results demonstrate that L-DOPA needed to be converted to dopamine to have this effect *ex vivo*. Accordingly, L-DOPA did not inhibit the VEGF-induced proliferation of HCECs that do not express the DDC and can't convert L-DOPA to dopamine. Dopamine on the other hand, dose dependently inhibited vascular sprouting from choroidal explants and VEGF induced HCEC proliferation.

Taken together this *ex vivo* and *in vitro* data showed that Dopamine, and not L-DOPA directly, inhibits proliferation of HCEC and choroidal angiogenesis. Dopamine exerts its biological effects via dopamine receptors that cannot be activated by L-DOPA (Misu et al. 1996). Interestingly DR2, which is expressed in HCEC, is the only DR that is increased in laser-induced proliferation of choroidal endothelial cells. Pharmacological DR2 blockage,

using the highly specific antagonist Eticlopride (Martelle & Nader 2008; Seeman & Ulpian 1988), completely inhibited the dopamine-dependant anti-angiogenic effect on choroidal vascular sprouting. These results and the observation that a highly selective DR2 agonist Quinpirole (Malo et al. 2010; Seeman & Schaus 1991), but not other DR agonists, was able to mimick dopamine's anti-angiogenicity, showed that the anti-angiogenic effect of dopamine were mediated by DR2. Although this is, to our knowledge, the first report that DR2 activation inhibits CNV, Quinpirole has been shown to inhibit tumoral angiogenesis (Basu et al. 2001; Hoepfner et al. 2015) and Eticlopride to promote neovascularization in dermal wound healing (Shome et al. 2011). Indeed, DR2 activation by dopamine has been shown to inhibit endothelial cell proliferation, as it blocks VEGFR2 phosphorylation and subsequent downstream signaling (Basu et al. 2001; Sarkar et al. 2004; Sinha et al. 2009). These observations suggest that it is likely the activation of DR2 on vascular endothelial cells that inhibits CNV in our models, although we do not excluded that DR2 activation on RPE cells or subretinal MPs represses the release of angiogenic factors.

Most importantly, when we co-administered the DR2 antagonist Eticlopride with L-DOPA/DDI in laser-injured mice *in vivo*, we completely abolished the anti-angiogenic effect of the PD treatment. This result confirms that the anti-angiogenic effect of L-DOPA/DDI treatment we observed *in vivo* in experimental mice, but also in PD patients, necessitates the conversion of L-DOPA to dopamine and the activation of the DR2 receptor. Finally, we show that the administration of the DR2 agonist Quinpirole as a monotherapy was sufficient to significantly inhibit pathogenic subretinal CNV. Our work, from the epidemiological observation of reduced nAMD incidence in L-DOPA/DDI treated PD patients to the identification of DR2 activation as the likely underlying mechanism, strongly suggests that preventive systemically administered DR2 agonists have the potential to prevent the

progression of high risk intermediate AMD patients to nAMD and reduce their continuous need for repeated intravitreal anti-VEGF injections.

Acknowledgments:

This work was supported by grants from INSERM, ANR MACLEAR (ANR-15-CE14-0015-01), LABEX LIFESENSES [ANR-10-LABX-65] supported by the ANR (Programme d'Investissements d'Avenir [ANR-11-IDEX-0004-02]), IHU FOReSIGHT [ANR-18-IAHU-0001] supported by French state funds managed by the Agence Nationale de la Recherche within the Investissements d'Avenir program, Carnot, and the Association de Prévoyance Santé de ALLIANZ.

Materials and methods

Animals

Wild-type (C57BL/6J) mice were obtained from Janvier Labs. They were kept under specific pathogen-free condition in a 12-h light/dark cycle and had access to food and water *ad libitum*. Upon arrival, mice were acclimated for at least 1 week before any experimentation. All experimental protocols and procedures were approved by the local animal care ethics committee C2EA-05 “Charles Darwin”.

Chemicals/treatments

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine hydrochloride (MPTP-HCl), L-3,4-dihydroxyphenylalanine methyl ester and Benserazide hydrochloride were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Dopamine, Quinpirole, SKF38393, PD168077 and Eticlopride were purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK). Human recombinant VEGF165 was purchased from R&D (Minneapolis, MN, USA).

MPTP model

For all experiments, the acute MPTP model was used as previously described (Jackson-Lewis & Przedborski 2007). Briefly, mice received 4 intraperitoneal (i.p) injections of either a control saline solution or MPTP-HCl (20 mg/kg) at 2-h intervals and were kept for 48-h at 28°C before returning to 22°C for the rest of the experiment. MPTP intoxication resulted in mortality rates between 10-30%.

Laser injury model

Eight-weeks-old male mice were anesthetized with i.p injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). After pupil dilation, laser coagulations were performed with a 532-nm

Laser injury model

Eight-weeks-old male mice were anesthetized with i.p injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). After pupil dilation, laser coagulations were performed with a 532-nm ophthalmological laser Yag Eyelite (Vitra Laser, Alcon, Rueil-Malmaison, France) mounted on an operating microscope. Four impacts per were performed for immunochemistry assays and 10 to 12 impacts per eye were performed for qPCR assays (450 mW, 50 ms and 250µm).

Immunohistochemistry and histology

Murine eyes were fixed with paraformaldehyde 4% (Sigma) for 45 minutes and then cautiously dissected to separate choroid from retina. Choroidal and retinal flatmounts were stained depending on experimentation with polyclonal rat anti-mouse CD102 (1:200, BD Biosciences Pharmingen), polyclonal rabbit anti-mouse IBA-1 (1:400, Wako), appropriate secondary fluorescent antibodies and counterstained with Hoechst (Invitrogen). Preparations were observed with fluorescence microscope (DM5500, Leica). All quantifications were done using the open-source Fiji Software (an expanded version of ImageJ, v1.50b).

Deeply anesthetized mice were perfused with PBS, followed by 100 ml of paraformaldehyde 4% to fix the brain tissue. The brains were dissected and stained with monoclonal anti-mouse Tyrosine Hydroxylase (1:200, Immunostar).

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

Total RNA was isolated with Nucleospin RNAII (Machery Nagel). RNA yields were then measured at 260 nm using the NanoDrop™ 8000 spectrophotometer. Single-strand cDNA was synthesized using 1 µg of total total RNA pretreated with DNase amplification grade, oligo-dT as primer and superscript II reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific). RT-PCR was realized by the StepOne Plus real-time PCR system (Applied Biosystems), using 1/100 of cDNA incubated with the polymerase and the appropriate amounts of nucleotides

(PowerSYBR Green PCR mix, Applied Biosystems). PCR reactions were performed in 45 cycles of 15 s at 95°C and 45 s at 60°C. Results were normalized by expression of Actine2 or RPS26. Primers were purchased from IDT and sequence are available upon request.

Vascular sprouting from choroid *ex vivo*

Eyes were enucleated from two weeks-old C57BL/6J pups and kept in ice-cold Opti-MEM Reduced Serum Media (Opti-MEM) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) before dissection. The choroid-scleral complex was separated from the other eye tissues and cut into approximately 1 mm×1 mm. Choroid/sclera fragments were placed in growth factor-reduced phenol red free matrigel (Corning, Boulogne Billancourt, France) seeded in 96 well plates.

Choroid/sclera fragments were then cultured for 3 days in Endothelial Cell Growth Media 2 (ECGM-2) (Promocell GmbH, Heidelberg, Germany) supplemented with 1% penicillin/streptomycin in a 37°C cell culture incubator. On day 3, Choroid fragments were treated with specific molecules as described from day 3 until day 6 of culture. Photos of individual explants were taken and the areas of sprouting were quantified with Image J software (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA). The surface of each individual choroidal explant and pre-incubation sprouts at day 3 was subtracted from the surface at day 6 to calculate the vascular sprouting that occurred in the presence or absence of specific treatment.

Cell proliferation assay

4000 HCECs were seeded in a 24-well plate pre-coated by Gelatine, cultured for 24h in ECGM-2, serum-starved for 24h in Opti-MEM, and then treated with either PBS, dopamine or L-DOPA, followed 10 minutes later by addition of 10 ng/ml VEGF. After culture for 24h, cells were fixed by 4% paraformaldehyde (Sigma), nuclei were stained with Hoechst

(Invitrogen) and automatically counted under fluorescent microscope (Arrayscan VTI HCS Reader, Thermofisher Scientific).

Statistical Analysis

Graph Pad 7 (GraphPad Software) was used for data analysis. All values are reported as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis and variance analysis was performed by one-way ANOVA, corrected by Bonferroni post-test for multiple comparison, or Mann-Whitney U-test for two-group comparison depending on the experimental design.

References

- Baek SK, Kim JH, Kim JW & Kim CG (2019) Increase in the Population of Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration Who Underwent Long-Term Active Treatment. *Sci. Rep.* 9, 1–10.
- Basu S, Nagy JA, Pal S, Vasile E, Eckelhoefer IA, Bliss VS, Manseau EJ, Dasgupta PS, Dvorak HF & Mukhopadhyay D (2001) The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nat. Med.* 7, 569–574.
- Bloch SB, Larsen M & Munch IC (2012) Incidence of legal blindness from age-related macular degeneration in denmark: year 2000 to 2010. *Am. J. Ophthalmol.* 153, 209–213.e2.
- Brilliant MH, Vaziri K, Connor TB, Schwartz SG, Carroll JJ, McCarty CA, Schrodi SJ, Hebbring SJ, Kishor KS, Flynn HW, Moshfeghi AA, Moshfeghi DM, Fini ME & McKay BS (2016) Mining Retrospective Data for Virtual Prospective Drug Repurposing: L-DOPA and Age-related Macular Degeneration. *Am. J. Med.* 129, 292–298.
- Ceballos-Baumann AO, von Kummer R, Eckert W & Weicker H (1990) Controlled-release levodopa/benserazide (Madopar HBS): clinical observations and levodopa and dopamine plasma concentrations in fluctuating parkinsonian patients. *J. Neurol.* 237, 24–28.
- Chakroborty D, Sarkar C, Mitra RB, Banerjee S, Dasgupta PS & Basu S (2004) Depleted dopamine in gastric cancer tissues: dopamine treatment retards growth of gastric cancer by inhibiting angiogenesis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 4349–4356.
- Choi S, Jahng WJ, Park SM & Jee D (2020) Association of Age-Related Macular Degeneration on Alzheimer or Parkinson Disease: A Retrospective Cohort Study. *Am. J. Ophthalmol.* 210, 41–47.
- Chung S-D, Ho J-D, Hu C-C, Lin H-C & Sheu J-J (2014) Increased risk of Parkinson disease following a diagnosis of neovascular age-related macular degeneration: a retrospective cohort study. *Am. J. Ophthalmol.* 157, 464–469.e1.
- Colijn JM, Buitendijk GHS, Prokofyeva E, Alves D, Cachulo ML, Khawaja AP, Cougnard-Gregoire A, Merle BMJ, Korb C, Erke MG, Bron A, Anastasopoulos E, Meester-Smoor MA, Segato T, Piermarocchi S, de Jong PTVM, Vingerling JR, Topouzis F, Creuzot-Garcher C, Bertelsen G, Pfeiffer N, Fletcher AE, Foster PJ, Silva R, Korobelnik J-F, Delcourt C, Klaver CCW, EYE-RISK consortium & European Eye Epidemiology (E3) consortium (2017) Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Europe: The Past and the Future. *Ophthalmology* 124, 1753–1763.
- D'Amore PA (1994) Mechanisms of retinal and choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 3974–3979.
- Derouiche A & Asan E (1999) The dopamine D2 receptor subfamily in rat retina: ultrastructural immunogold and in situ hybridization studies. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1391–1402.
- Dutton J, Copeland LG, Playfer JR & Roberts NB (1993) Measuring L-dopa in plasma and urine to monitor therapy of elderly patients with Parkinson disease treated with L-dopa and a dopa decarboxylase inhibitor. *Clin. Chem.* 39, 629–634.
- Duty S & Jenner P (2011) Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br. J. Pharmacol.* 164, 1357–1391.
- Etminan M, Samii A & He B (2018) Risk of Parkinson's disease in patients with neovascular age-related macular degeneration. *J. Curr. Ophthalmol.* 30, 365–367.
- Falk T, Congrove NR, Zhang S, McCourt AD, Sherman SJ & McKay BS (2012) PEDF and VEGF-A Output from Human Retinal Pigment Epithelial Cells Grown on Novel Microcarriers. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3323925/> [Accessed April 16, 2020].
- Feldkaemper M & Schaeffel F (2013) An updated view on the role of dopamine in myopia. *Exp. Eye Res.* 114, 106–119.
- Guillonneau X, Eandi CM, Paques M, Sahel J-A, Sapieha P & Sennlaub F (2017) On phagocytes and macular degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 61, 98–128.
- Harnois C & Di Paolo T (1990) Decreased dopamine in the retinas of patients with Parkinson's disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31, 2473–2475.
- Hirsch EC & Hunot S (2009) Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol.* 8, 382–397.

- Hirsch EC, Jenner P & Przedborski S (2013) Pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 28, 24–30.
- Hoepfner LH, Wang Y, Sharma A, Javeed N, Van Keulen VP, Wang E, Yang P, Roden AC, Peikert T, Molina JR & Mukhopadhyay D (2015) Dopamine D2 receptor agonists inhibit lung cancer progression by reducing angiogenesis and tumor infiltrating myeloid derived suppressor cells. *Mol. Oncol.* 9, 270–281.
- Huang X, Chen PC & Poole C (2004) APOE-[epsilon]2 allele associated with higher prevalence of sporadic Parkinson disease. *Neurology* 62, 2198–2202.
- Jackson CR, Chaurasia SS, Zhou H, Haque R, Storm DR & Iuvone PM (2009) Essential roles of dopamine D4 receptors and the type 1 adenylyl cyclase in photic control of cyclic AMP in photoreceptor cells. *J. Neurochem.* 109, 148–157.
- Jackson-Lewis V & Przedborski S (2007) Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nat. Protoc.* 2, 141–151.
- Klein R, Peto T, Bird A & Vannewkirk MR (2004) The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* 137, 486–495.
- Ko GY-P (2020) Circadian regulation in the retina: From molecules to network. *Eur. J. Neurosci.* 51, 194–216.
- de Lau LML & Breteler MMB (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 5, 525–535.
- Lavalette S, Raoul W, Houssier M, Camelo S, Levy O, Calippe B, Jonet L, Behar-Cohen F, Chemtob S, Guillonnet X, Combadière C & Sennlaub F (2011) Interleukin-1 β inhibition prevents choroidal neovascularization and does not exacerbate photoreceptor degeneration. *Am. J. Pathol.* 178, 2416–2423.
- Lopez VM, Decatur CL, Stamer WD, Lynch RM & McKay BS (2008) L-DOPA is an endogenous ligand for OA1. *PLoS Biol.* 6, e236.
- Lundblad M, Usiello A, Carta M, Håkansson K, Fisone G & Cenci MA (2005) Pharmacological validation of a mouse model of L-DOPA-induced dyskinesia. *Exp. Neurol.* 194, 66–75.
- Malo M, Brive L, Luthman K & Svensson P (2010) Selective pharmacophore models of dopamine D(1) and D(2) full agonists based on extended pharmacophore features. *ChemMedChem* 5, 232–246.
- Martelle JL & Nader MA (2008) A Review of the Discovery, Pharmacological Characterization, and Behavioral Effects of the Dopamine D2-Like Receptor Antagonist Eticlopride. *CNS Neurosci. Ther.* 14, 248–262.
- McKay GJ, Patterson CC, Chakravarthy U, Dasari S, Klaver CC, Vingerling JR, Ho L, de Jong PTVM, Fletcher AE, Young IS, Seland JH, Rahu M, Soubrane G, Tomazzoli L, Topouzis F, Vioque J, Hingorani AD, Sofat R, Dean M, Sawitzke J, Seddon JM, Peter I, Webster AR, Moore AT, Yates JRW, Cipriani V, Fritsche LG, Weber BHF, Keilhauer CN, Lotery AJ, Ennis S, Klein ML, Francis PJ, Stambolian D, Orlin A, Gorin MB, Weeks DE, Kuo C-L, Swaroop A, Othman M, Kanda A, Chen W, Abecasis GR, Wright AF, Hayward C, Baird PN, Guymer RH, Attia J, Thakkinian A & Silvestri G (2011) Evidence of association of APOE with age-related macular degeneration: a pooled analysis of 15 studies. *Hum. Mutat.* 32, 1407–1416.
- Ming M, Li X, Fan X, Yang D, Li L, Chen S, Gu Q & Le W (2009) Retinal pigment epithelial cells secrete neurotrophic factors and synthesize dopamine: possible contribution to therapeutic effects of RPE cell transplantation in Parkinson's disease. *J. Transl. Med.* 7, 53.
- Misu Y, Goshima Y, Ueda H & Okamura H (1996) Neurobiology of L-DOPAergic systems. *Prog. Neurobiol.* 49, 415–454.
- Montassar F, Darche M, Blaizot A, Augustin S, Conart J-B, Millet A, Elayeb M, Sahel J-A, Réaux-Le Goazigo A, Sennlaub F, Marrakchi N, Messadi E & Guillonnet X (2017) Lebecetin, a C-type lectin, inhibits choroidal and retinal neovascularization. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 31, 1107–1119.
- Neve KA, Seamans JK & Trantham-Davidson H (2004) Dopamine receptor signaling. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 24, 165–205.
- Nguyen-Legros J, Versaux-Botteri C & Vernier P (1999) Dopamine receptor localization in the mammalian retina. *Mol. Neurobiol.* 19, 181–204.

- Olanow CW & Tatton WG (1999) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 123–144.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Naini AB, Jakowec M, Petzinger G, Miller R & Akram M (2001) The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J. Neurochem.* 76, 1265–1274.
- Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD, De Deyn PP, Clarke CE & Lang AE (2000) A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. *N. Engl. J. Med.* 342, 1484–1491.
- Rofagha S, Bhisitkul RB, Boyer DS, Sadda SR & 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.
- Rose S, Jenner P & Marsden CD (1988) The effect of carbidopa on plasma and muscle levels of L-dopa, dopamine, and their metabolites following L-dopa administration to rats. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 3, 117–125.
- Sanchez-Jiménez F, Pino-Angéles A, Rodríguez-López R, Morales M & Urdiales JL (2016) Structural and functional analogies and differences between histidine decarboxylase and aromatic l-amino acid decarboxylase molecular networks: Biomedical implications. *Pharmacol. Res.* 114, 90–102.
- Sarkar C, Chakroborty D, Mitra RB, Banerjee S, Dasgupta PS & Basu S (2004) Dopamine in vivo inhibits VEGF-induced phosphorylation of VEGFR-2, MAPK, and focal adhesion kinase in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287, H1554–1560.
- Sarks SH (1976) Ageing and degeneration in the macular region: a clinico-pathological study. *Br. J. Ophthalmol.* 60, 324–341.
- Schneider F, Erisson L, Beygi H, Bradbury M, Cohen-Barak O, Grachev ID, Guzy S, Loupe PS, Levi M, McDonald M, Savola J-M, Papapetropoulos S, Tracewell WG, Velinova M & Spiegelstein O (2018) Pharmacokinetics, metabolism and safety of deuterated L-DOPA (SD-1077)/carbidopa compared to L-DOPA/carbidopa following single oral dose administration in healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 84, 2422–2432.
- Seeman P & Schaus JM (1991) Dopamine receptors labelled by [3H]quinpirole. *Eur. J. Pharmacol.* 203, 105–109.
- Seeman P & Ulpian C (1988) Dopamine D1 and D2 receptor selectivities of agonists and antagonists. *Adv. Exp. Med. Biol.* 235, 55–63.
- Shao Z, Friedlander M, Hurst CG, Cui Z, Pei DT, Evans LP, Juan AM, Tahir H, Duhamel F, Chen J, Sapieha P, Chemtob S, Joyal J-S & Smith LEH (2013) Choroid Sprouting Assay: An Ex Vivo Model of Microvascular Angiogenesis. *PLOS ONE* 8, e69552.
- Shome S, Rana T, Ganguly S, Basu B, Chaki Choudhury S, Sarkar C, Chakroborty D, Dasgupta PS & Basu S (2011) Dopamine regulates angiogenesis in normal dermal wound tissues. *PloS One* 6, e25215.
- Sinha S, Vohra PK, Bhattacharya R, Dutta S, Sinha S & Mukhopadhyay D (2009) Dopamine regulates phosphorylation of VEGF receptor 2 by engaging Src-homology-2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2. *J. Cell Sci.* 122, 3385–3392.
- Tambasco N, Romoli M & Calabresi P (2018) Levodopa in Parkinson's Disease: Current Status and Future Developments. *Curr. Neuropharmacol.* 16, 1239–1252.
- Troncoso-Escudero P, Parra A, Nassif M & Vidal RL (2018) Outside in: Unraveling the Role of Neuroinflammation in the Progression of Parkinson's Disease. *Front. Neurol.* 9, 860.
- Witkovsky P (2004) Dopamine and retinal function. *Doc. Ophthalmol. Adv. Ophthalmol.* 108, 17–40.
- Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng C-Y & Wong TY (2014) Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Health* 2, e106–116.
- Zhou X, Pardue MT, Iuvone PM & Qu J (2017) Dopamine signaling and myopia development: What are the key challenges. *Prog. Retin. Eye Res.* 61, 60–71.

Figure Legends

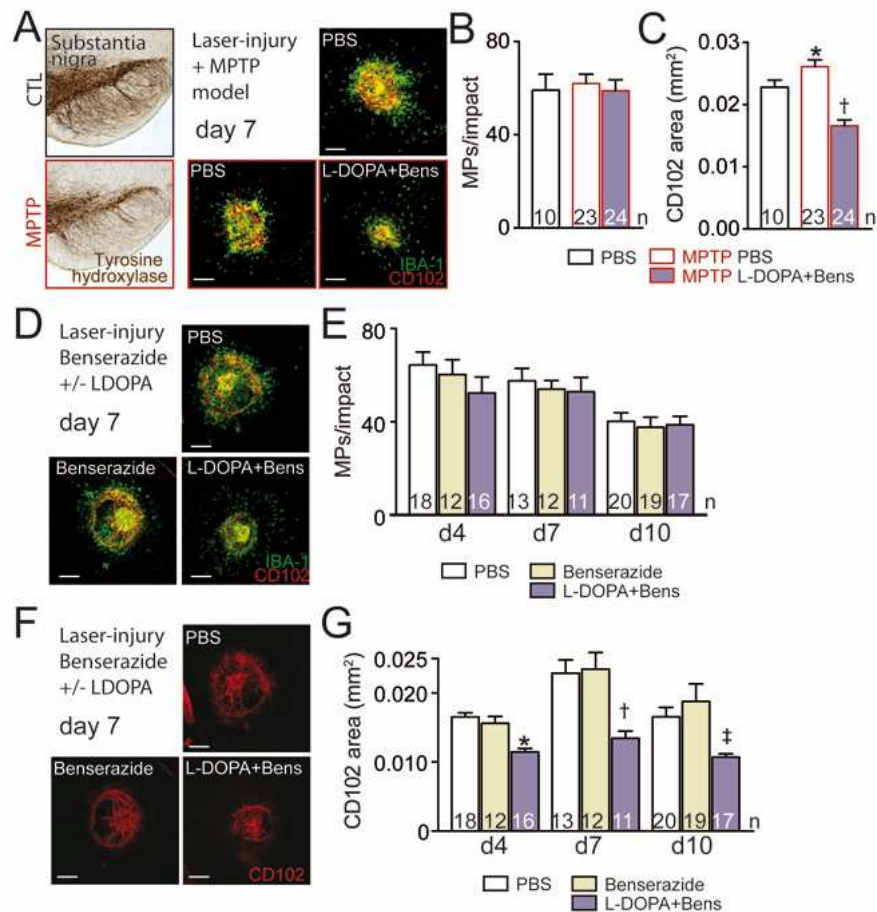


Fig. 1: L-DOPA/decarboxylase inhibitor treatment prevents choroidal neovascularisation independently of subretinal inflammation and the loss of dopaminergic neurons in mice

A. Tyrosine hydroxylase stained substantia nigra of 9-week-old C57BL/6J mice that received PBS or MPTP intoxication at 6-weeks of age and laser-injury at 8-weeks. IBA-1- (green) and CD102- (red) stained choroidal flatmounts, 7 days after laser injury treated by PBS,

Benserazide (12mg/kg) or L-DOPA (30mg/kg)+Benserazide (12mg/kg) starting one week before the injury until sacrifice. Scale bar: 200µm.

B. Quantification of subretinal IBA-1⁺ mononuclear phagocytes counted on the RPE at a distance of 0-500µm to CD102⁺ CNV, 7 days after the laser injury of 8-week-old C57BL/6J mice that received PBS or MPTP intoxication at 6-weeks of age, and treated by PBS or L-DOPA (30mg/kg)+Benserazide (12mg/kg) starting one week before the laser injury until sacrifice (one-way ANOVA/Bonferroni test P =non significant).

C. CD102⁺ CNV area 7 days after laser injury of 8-week-old C57BL/6J mice that received PBS or MPTP intoxication at 6-weeks of age, and treated by PBS or L-DOPA (30mg/kg)+Benserazide (12mg/kg) starting one week before the laser injury until sacrifice (one-way ANOVA/Bonferroni test: CTL-PBS versus MPTP-PBS $*P=0.12$ (non significant); MPTP-PBS versus MPTP-L-DOPA+Benserazide $^{\dagger}P<0.0001$).

D. IBA-1- (green) and CD102- (red) stained choroidal flatmounts 7 days after laser injury of 8-week-old C57BL/6J mice treated by PBS, Benserazide (12mg/kg) or L-DOPA (30mg/kg)+Benserazide (12mg/kg) starting one week before the injury until sacrifice. Scale bar: 200µm.

E. Quantification of subretinal IBA-1⁺ mononuclear phagocytes counted on the RPE at a distance of 0-500µm to CD102⁺ CNV 4, 7 and 10 days after the laser injury of 8-week-old C57BL/6J mice treated by PBS, Benserazide (12mg/kg) or L-DOPA (30mg/kg)+Benserazide (12mg/kg) starting one week before the laser injury until sacrifice (one-way ANOVA/Bonferroni test P =non significant for each time point).

F. CD102- (red) stained choroidal flatmounts 7 days after laser injury of 8-week-old C57BL/6J mice treated by PBS, Benserazide (12mg/kg) or L-DOPA (30mg/kg)+Benserazide (12mg/kg) starting one week before the injury until sacrifice. Scale bar: 200µm.

G. CD102⁺ CNV area 4, 7 and 10 days after laser injury of 8-week-old C57BL/6J mice treated by PBS, Benserazide (12mg/kg) or L-DOPA (30mg/kg)+Benserazide (12mg/kg) starting one week before the injury until sacrifice (one-way ANOVA/Bonferroni test: d4 L-DOPA+Benserazide versus PBS * $P<0.0001$ and d4 L-DOPA+Benserazide versus Benserazide * $P=0.0001$; d7 L-DOPA+Benserazide versus PBS † $P=0.0020$ and d7 L-DOPA+Benserazide versus Benserazide † $P=0.0015$; d10 L-DOPA+Benserazide versus PBS ‡ $P=0.0073$ and d10 L-DOPA+Benserazide versus Benserazide ‡ $P=0.0002$).

Bens: Benserazide; CTL: control; MPs: mononuclear phagocytes; MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. n= indicated in each column for each group

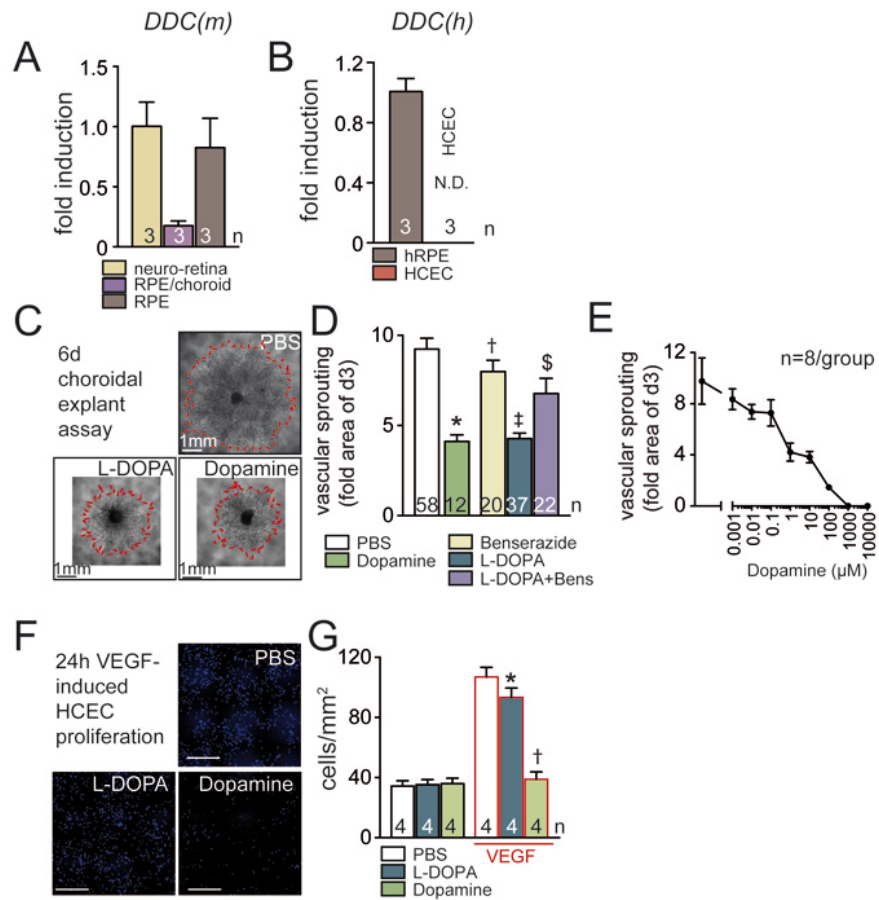


Fig. 2: The decarboxylation of L-DOPA to dopamine is necessary for the anti-angiogenic effect on CNV *ex-vivo* and *in vitro*

A. Quantitative Rt-PCR of Dopa-decarboxylase (DDC) mRNAs normalized with β -actine of fresh 8-week-old C57BL/6J mice neuro-retina, RPE/choroid and choroid.

B. Quantitative Rt-PCR of Dopa-decarboxylase (DDC) mRNAs normalized with β -actine of fresh RPE from donor eye and HCEC. *ND*: not detected.

C. Representative microphotographs of choroidal explants of 2-week-old C57BL/6J pups at day 6 after 3-day-treatment by PBS, L-DOPA (1 μ M) or Dopamine (1 μ M).

D. Quantification of vascular sprouting area between day 3 and 6 from choroidal explants of 2-week-old C57BL/6J pups treated with Dopamine (1 μ M), Benserazide (10 μ M), L-DOPA (1 μ M) or preincubated 1 hour with Benserazide (10 μ M) before the addition of L-DOPA (1 μ M) (one-way ANOVA/Bonferroni test: PBS versus Dopamine * P <0.0001; PBS versus Benserazide $^{\dagger}P$ =non significant; Benserazide versus L-DOPA $^{\ddagger}P$ =0.001; L-DOPA versus L-DOPA+Benserazide $^{\S}P$ =0.037).

E. Quantification of vascular sprouting area between day 3 and 6 from choroidal explants of 2-week-old C57BL/6J pups, treated by dopamine at different concentration.

F. Representative microphotographs of DAPI⁺ HCECs after 24h of treatment by PBS, L-DOPA (1 μ M) or Dopamine (1 μ M) in addition to VEGF (10ng/ml). Scale bar: 200 μ m.

G. Quantification of DAPI⁺ HCECs after 24h of treatment by PBS, L-DOPA (1 μ M) or Dopamine (1 μ M) in addition to VEGF (10ng/ml) (one-way ANOVA/Bonferroni test: PBS versus L-DOPA * P =non significant; Dopamine versus any other group $^{\dagger}P$ <0.0001).

Bens: Benserazide; CTL: control; HCEC: human choroidal endothelial cells; hRPE: fresh human retinal pigment epithelium; N.D.: non detected; VEGF: vascular endothelial growth factor. n=indicated in each column for each group

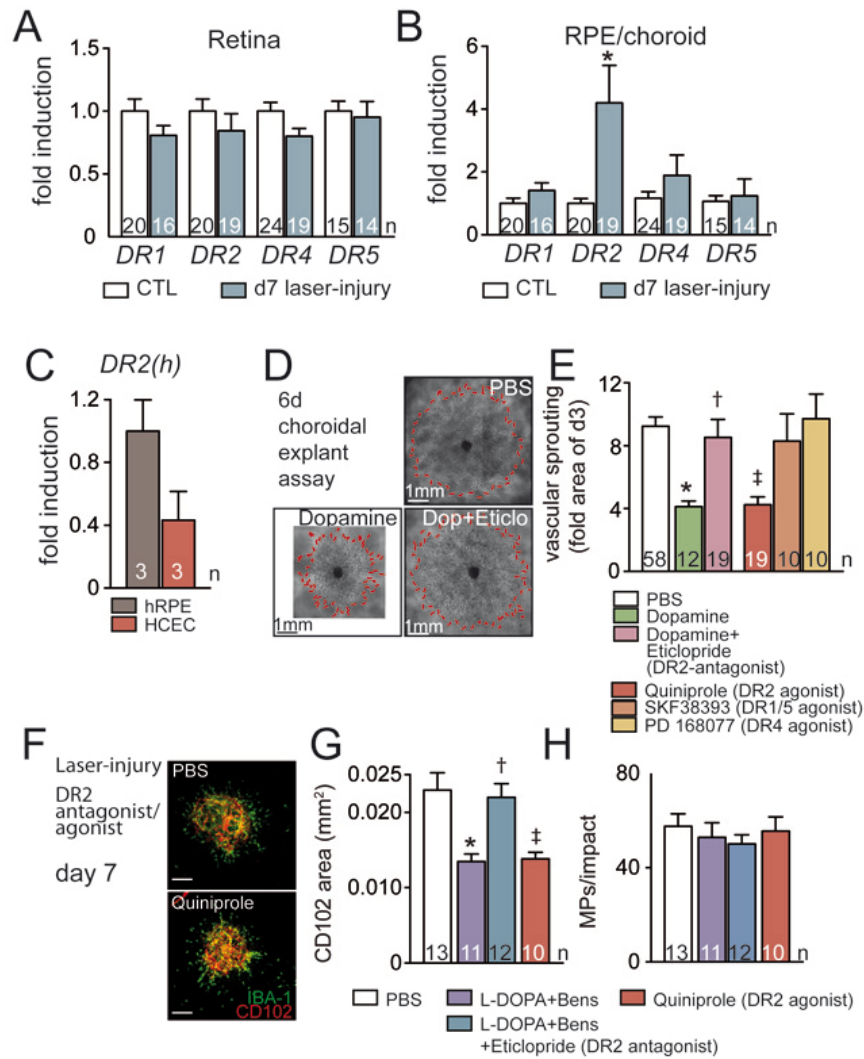


Fig. 3: Dopamine receptor 2 activation mediates the CNV inhibition observed under L-DOPA / decarboxylase inhibitor treatment *in vivo*

A. Quantitative Rt-PCR of dopamine receptors (DR1-DR5) mRNAs normalized with β -actine of 8-week-old C57BL/6J mice retina 7 days after laser injury compared to control (CTL) mice

(Mann-Whitney *U*-test for each DR in CNV group versus each DR in CTL group *P*=non-significant).

B. Quantitative Rt-PCR of dopamine receptors (DR1-DR5) mRNAs normalized with β -actine of 8-week-old C57BL/6J mice choroid 7 days after laser injury compared to control mice (Mann-Whitney *U*-test for DR2 in CNV group versus DR2 in CTL group **P*=0.04; each other DR in CNV group versus each other DR in CTL group *P*=non-significant).

C. Quantitative Rt-PCR of dopamine receptor 2 (DR2) mRNAs normalized with β -actine of fresh RPE from donor eye and HCEC.

D. Representative microphotographs of choroidal explants of 2-week-old C57BL/6J pups at day 6 after 3-day-treatment by PBS, Dopamine (1 μ M) or pretreated 1 hour by Eticlopride (10 μ M) before the addition of Dopamine (1 μ M).

E. Quantification of choroidal vascular sprouting from 2-week-old C57BL/6J pups at day 6 after 3 days of treatment by PBS, Dopamine (1 μ M), pretreated 1 hour with Eticlopride (10 μ M) before the addition of Dopamine (1 μ M), Quinpirole (10 μ M), SKF38393 (10 μ M) or PD168077 (10 μ M) (one-way ANOVA/Bonferroni test: PBS versus Dopamine **P*=0.0005; Dopamine versus Dopamine+Eticlopride † *P*=0.015; PBS versus Quinpirole ‡ *P*<0.0001; PBS versus SKF38393 and PD168077 *P*=non-significant).

F. IBA-1- (green) and CD102- (red) stained choroidal flatmounts 7 days after laser injury of 8-week-old C57BL/6J mice treated by PBS or Quinpirole (5mg/kg) starting one week before the injury until sacrifice. Scale bar: 200 μ m.

G. Quantification of subretinal IBA-1⁺ mononuclear phagocytes counted on the RPE at a distance of 0-500 μ m to CD102⁺ CNV 7 days after the laser injury of 8-week-old C57BL/6J mice and treated by PBS, L-DOPA (30mg/kg)+Benserazide (12mg/kg), L-DOPA

(30mg/kg)+Benserazide (12mg/kg)+Eticlopride (1mg/kg) or Quinpirole (5mg/kg) starting one week before the injury until sacrifice (one-way ANOVA/Bonferroni test P =non significant for each group).

H. CD102⁺ CNV area 7 days after laser injury of 8-week-old C57BL/6J mice and treated by PBS, L-DOPA (30mg/kg)+Benserazide (12mg/kg), L-DOPA (30mg/kg)+Benserazide (12mg/kg)+Eticlopride (1mg/kg) or Quinpirole (5mg/kg) starting one week before the injury until sacrifice (one-way ANOVA/Bonferroni test: PBS versus L-DOPA $*P=0.0003$; L-DOPA+Benserazide versus L-DOPA+Benserazide+Eticlopride $^{\dagger}P=0.0011$; PBS versus Quinpirole $^{\ddagger}P=0.0003$).

Bens: Benserazide; CTL: control; HCEC: human choroidal endothelial cells; hRPE: fresh human retinal pigment epithelium; MPs: mononuclear phagocytes; RPE: retinal pigment epithelium. n=indicated in each column for each group

IV- DISCUSSION

L'analyse de cohortes rétrospectives a montré que la L-DOPA, dans la majorité des cas prescrite chez des patients atteints de la maladie de Parkinson, était protectrice sur le développement d'une DMLA et notamment pour sa forme néovasculaire [492]. Cependant, cette étude épidémiologique ne permet pas de déterminer si du traitement par L-DOPA ou de la maladie de Parkinson induit cette diminution du risque. Ces hypothèses nécessitaient d'être vérifiées par des études plus ciblées sur cette pathologie. Nous avons donc exploré les mécanismes physiopathologiques d'un possible lien entre la maladie de Parkinson, le traitement par L-DOPA, et la DMLA.

La voie inflammatoire par perte du privilège immunitaire pourrait être le premier lien entre ces pathologies. L'angiogenèse, caractéristique au stade tardif de la DMLA, pourrait aussi être modulée par des facteurs associés à la maladie de Parkinson et à son traitement et constituerait un deuxième lien probable.

Pour répondre à la première question, nous avons utilisé plusieurs modèles cellulaires ou murins permettant de reproduire en partie les mécanismes impliqués dans ces pathologies. Dans un premier temps nous avons créé un système de co-culture associant EPR et Mos reproduisant *in vitro* les interactions entre ces 2 types cellulaires existant chez l'homme. Ainsi, nous avons montré qu'en co-culture, l'EPR de porc permettait d'éliminer les Mos à leur contact, mais pas les Mos activés [58]. Ces derniers entraînant par ailleurs des altérations du fonctionnement de l'EPR [58,59]. Dans notre modèle de co-culture associant EPR et Mos, nous avons montré que la L-DOPA et/ou la benserazide n'entraînait pas d'altérations des mécanismes anti-inflammatoires de l'EPR. Afin de confirmer ces résultats, nous avons utilisé des modèles *in vivo* en utilisant des souris, dont certaines souches pro-inflammatoires, sur des expérimentations d'illumination rétinienne. Celles-ci stimulent normalement le recrutement de PMs et nous n'avons pas montré de différences entre les groupes de traitement. Ces expérimentations n'ont pas mis en évidence de lien entre le traitement de la maladie de Parkinson par la L-DOPA et le développement d'une DMLA sur les mécanismes inflammatoires.

Concernant l'angiogenèse, les résultats sont plus intéressants. La formation de néovaisseaux choroïdiens, caractéristiques de la DMLA exsudative, peut être induite par traumatisme laser

[217] et l'intoxication au MPTP induit une perte des neurones dopaminergiques, mimant les modifications physiopathologiques de la maladie de Parkinson [380,394,516,520]. Nos expérimentations montrent qu'une intoxication au MPTP et la perte des neurones dopaminergiques dans la substance noire n'altèrent pas la formation de la néovascularisation choroïdienne provoquée par le laser, ni l'inflammation sous rétinienne sous-jacente à ce modèle. Cependant, lorsque les souris MPTP ont été traitées par une association de L-DOPA avec un inhibiteur de la DDC, comme les patients atteints de Parkinson, les néovaisseaux étaient significativement diminués, mais pas le nombre de PMs infiltrants. Ces résultats suggèrent que le traitement de la maladie de Parkinson, et non la perte en cellules dopaminergiques, inhibe significativement la formation de néovaisseaux choroïdiens. En effet, lorsque des souris non-intoxiquées ont été traitées par la L-DOPA avec un inhibiteur de la DDC, nous avons également retrouvé, et de manière similaire, une inhibition de l'angiogenèse sous rétinienne, sans modification de l'infiltration de PMs. La DDC seule n'ayant aucun effet.

La L-DOPA est convertie en dopamine par la DDC, et contrairement à la dopamine, elle peut passer en petite quantité dans le système nerveux central via la BHE. Une fois dans le compartiment cérébral, elle est aussi décarboxylée en dopamine par une DDC permettant de pallier au manque de ce neurotransmetteur dans la maladie de Parkinson. Ainsi, la L-DOPA est toujours prescrite en association avec un inhibiteur de la DDC périphérique afin de diminuer sa dégradation en dopamine périphérique et augmenter son passage cérébral [343]. Malgré cela, une partie de la L-DOPA est convertie en dopamine périphérique, augmentant ainsi les taux sanguin de ce neurotransmetteur, expliquant certains effets indésirables de la molécule (nausées, vomissements, hypotension orthostatique) [338,342,497,521]. Dans notre modèle, l'effet inhibiteur du traitement associant L-DOPA à la DDC peut ainsi être lié directement à la L-DOPA, ou à la dopamine. Sur les explants choroïdiens, la L-DOPA inhibe la prolifération vasculaire uniquement lorsque la DDC, retrouvée dans l'EPR [522], n'était pas inhibée. Ce résultat démontre ainsi que la L-DOPA a besoin d'être convertie en dopamine pour exercer son effet anti-angiogénique *ex vivo*. De la même manière la L-DOPA n'inhibe pas la prolifération induite par le VEGF sur des cultures de HCECs qui n'expriment pas la DDC et ne peuvent ainsi pas convertir la L-DOPA en dopamine. Par contre, la dopamine inhibe de manière dose-dépendante la prolifération vasculaire sur les explants choroïdiens et la prolifération des HCECs lorsqu'elle est induite par le VEGF.

Ensemble, ces données *ex vivo* et *in vitro* montrent que la dopamine, et non la L-DOPA, inhibent l'angiogenèse choroïdienne.

La dopamine agit via des récepteurs à la dopamine qui ne peuvent pas être activés par la L-DOPA [523]. Le récepteur D2, exprimé dans les HCECs, est le seul récepteur à la dopamine retrouvé augmenté dans notre modèle de néovascularisation choroïdienne induite par laser. Le blocage pharmacologique du récepteur D2, en utilisant l'antagoniste spécifique eticlopride, inhibe complètement l'effet anti-angiogénique de la dopamine sur la prolifération vasculaire des explants choroïdiens. Ces résultats ainsi que l'observation des effets anti-angiogéniques du quinpirole, un agoniste spécifique du récepteur D2, confirment que l'inhibition de la prolifération vasculaire est médiée par le récepteur D2. Nous avons ensuite confirmé ces données sur le modèle *in vivo* de néovascularisation induite par laser. Le quinpirole permettait de diminuer la néovascularisation de manière équivalente au groupe traité la L-DOPA associée au benserazide. L'eticlopride donné en même temps que la L-DOPA/benserazide permettait d'abolir l'effet anti-angiogénique.

Il a été précédemment montré que l'activation des récepteurs D2 diminuait l'angiogenèse tumorale [455,466] et que l'eticlopride augmentait la néovascularisation dans un modèle de cicatrisation cutanée [524]. En effet, l'activation du récepteur D2 par la dopamine diminue la phosphorylation du VEGFR-2 et ainsi sa signalisation intracellulaire sous-jacente pro-angiogénique [455,456,525].

Nous suggérons que ce mécanisme diminuant la réponse cellulaire au VEGF soit identique dans nos modèles d'angiogenèse choroïdienne traités par dopaminergiques, par activation du récepteur D2.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nos travaux ont été initiés par une observation épidémiologique montrant une diminution de l'incidence de la DMLA néovasculaire chez des patients parkinsoniens traités par L-DOPA. Le développement de nouveaux modèles cellulaires et des modèles animaux nous a permis d'identifier un mécanisme anti-angiogénique choroïdien impliquant le récepteur dopaminergique D2. L'analyse des résultats obtenus mettent ainsi en évidence une potentielle nouvelle cible thérapeutique dans la gestion de la DMLA.

D'éventuels analogues agonistes du récepteur D2 pourraient permettre d'éviter par exemple la transformation d'une DMLA intermédiaire à haut risque en une forme néovasculaire. Ces analogues pourraient aussi réduire le besoin en injections répétées d'anti-VEGF chez les patients. Ces hypothèses, concernant la pertinence de la cible des récepteurs D2 et de ses ligands et modulateurs, doivent être validées sur des modèles plus élaborés (souris KO pour D2 par exemple). Les récepteurs de la dopamine ayant fait l'objet de nombreuses études pharmacologiques et pharmaceutiques, il existe probablement des bibliothèques de ligands qualifiés qui pourraient faire l'objet de repositionnement sur la pathologie DMLA. L'utilisation de ceux-ci permettrait peut-être de réduire l'incidence de cette maladie dont le fardeau, tant pour le patient que pour l'ophtalmologiste et le système de santé, va peser de plus en plus lourd dans nos sociétés vieillissantes.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Augood CA, Vingerling JR, de Jong PTVM, *et al.* Prevalence of age-related maculopathy in older Europeans: the European Eye Study (EUREYE). *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960* 2006;**124**:529–35. doi:10.1001/archopht.124.4.529
- 2 Delcourt C, Lacroux A, Carrière I, *et al.* The three-year incidence of age-related macular degeneration: the “Pathologies Oculaires Liées à l’Age” (POLA) prospective study. *Am J Ophthalmol* 2005;**140**:924–6. doi:10.1016/j.ajo.2005.05.002
- 3 Klein R, Peto T, Bird A, *et al.* The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2004;**137**:486–95. doi:10.1016/j.ajo.2003.11.069
- 4 Congdon N, O’Colmain B, Klaver CCW, *et al.* Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960* 2004;**122**:477–85. doi:10.1001/archopht.122.4.477
- 5 Jain GK, Warsi MH, Nirmal J, *et al.* Therapeutic stratagems for vascular degenerative disorders of the posterior eye. *Drug Discov Today* 2012;**17**:748–59. doi:10.1016/j.drudis.2012.03.006
- 6 Fajnkuchen F, Cohen S-Y. [Age-related macular degeneration and antivascular endothelial growth factor: a review]. *J Fr Ophtalmol* 2008;**31**:94–110.
- 7 Bloch SB, Larsen M, Munch IC. Incidence of legal blindness from age-related macular degeneration in denmark: year 2000 to 2010. *Am J Ophthalmol* 2012;**153**:209–213.e2. doi:10.1016/j.ajo.2011.10.016
- 8 Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials (CATT) Research Group, Maguire MG, Martin DF, *et al.* Five-Year Outcomes with Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration: The Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trials. *Ophthalmology* 2016;**123**:1751–61. doi:10.1016/j.ophtha.2016.03.045
- 9 Gillies MC, Campain A, Barthelmes D, *et al.* Long-Term Outcomes of Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Data from an Observational Study. *Ophthalmology* 2015;**122**:1837–45. doi:10.1016/j.ophtha.2015.05.010
- 10 Brown DM, Michels M, Kaiser PK, *et al.* Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology* 2009;**116**:57–65.e5. doi:10.1016/j.ophtha.2008.10.018
- 11 Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, *et al.* Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006;**355**:1419–31. doi:10.1056/NEJMoa054481
- 12 Klein R, Klein BEK, Knudtson MD, *et al.* Fifteen-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 2007;**114**:253–62. doi:10.1016/j.ophtha.2006.10.040
- 13 Fritsche LG, Chen W, Schu M, *et al.* Seven new loci associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet* 2013;**45**:433–9, 439e1–2. doi:10.1038/ng.2578
- 14 Thornton J, Edwards R, Mitchell P, *et al.* Smoking and age-related macular degeneration: a review of association. *Eye Lond Engl* 2005;**19**:935–44. doi:10.1038/sj.eye.6701978
- 15 Ferris FL, Wilkinson CP, Bird A, *et al.* Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2013;**120**:844–51. doi:10.1016/j.ophtha.2012.10.036
- 16 Ferris FL, Davis MD, Clemons TE, *et al.* A simplified severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 18. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960* 2005;**123**:1570–4. doi:10.1001/archopht.123.11.1570
- 17 Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, *et al.* An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol* 1995;**39**:367–74.
- 18 Curcio CA, Millican CL. Basal linear deposit and large drusen are specific for early age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960* 1999;**117**:329–39.

- 19 Zweifel SA, Imamura Y, Spaide TC, *et al.* Prevalence and significance of subretinal drusenoid deposits (reticular pseudodrusen) in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2010;**117**:1775–81. doi:10.1016/j.ophtha.2010.01.027
- 20 Zweifel SA, Spaide RF, Curcio CA, *et al.* Reticular pseudodrusen are subretinal drusenoid deposits. *Ophthalmology* 2010;**117**:303–312.e1. doi:10.1016/j.ophtha.2009.07.014
- 21 De Bats F, Mathis T, Mauget-Faÿsse M, *et al.* PREVALENCE OF RETICULAR PSEUDODRUSEN IN AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION USING MULTIMODAL IMAGING. *Retina Phila Pa* 2016;**36**:46–52. doi:10.1097/IAE.0000000000000648
- 22 Rózanowska M, Wessels J, Boulton M, *et al.* Blue light-induced singlet oxygen generation by retinal lipofuscin in non-polar media. *Free Radic Biol Med* 1998;**24**:1107–12. doi:10.1016/s0891-5849(97)00395-x
- 23 Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, *et al.* Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol* 2003;**48**:257–93.
- 24 Freund KB, Zweifel SA, Engelbert M. Do we need a new classification for choroidal neovascularization in age-related macular degeneration? *Retina Phila Pa* 2010;**30**:1333–49. doi:10.1097/IAE.0b013e3181e7976b
- 25 Age-Related Eye Disease Study Research Group. The Age-Related Eye Disease Study (AREDS): design implications. AREDS report no. 1. *Control Clin Trials* 1999;**20**:573–600.
- 26 Colijn JM, Buitendijk GHS, Prokofyeva E, *et al.* Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Europe: The Past and the Future. *Ophthalmology* 2017;**124**:1753–63. doi:10.1016/j.ophtha.2017.05.035
- 27 Age-Related Eye Disease Study Research Group. Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the age-related eye disease study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3. *Ophthalmology* 2000;**107**:2224–32.
- 28 Rudnicka AR, Jarrar Z, Wormald R, *et al.* Age and gender variations in age-related macular degeneration prevalence in populations of European ancestry: a meta-analysis. *Ophthalmology* 2012;**119**:571–80. doi:10.1016/j.ophtha.2011.09.027
- 29 Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, *et al.* Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 2005;**308**:419–21. doi:10.1126/science.1110359
- 30 Edwards AO, Ritter R, Abel KJ, *et al.* Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 2005;**308**:421–4. doi:10.1126/science.1110189
- 31 Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, *et al.* Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 2005;**308**:385–9. doi:10.1126/science.1109557
- 32 Miceli MV, Liles MR, Newsome DA. Evaluation of oxidative processes in human pigment epithelial cells associated with retinal outer segment phagocytosis. *Exp Cell Res* 1994;**214**:242–9. doi:10.1006/excr.1994.1254
- 33 Liang F-Q, Godley BF. Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: a possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2003;**76**:397–403.
- 34 Beatty S, Murray IJ, Henson DB, *et al.* Macular pigment and risk for age-related macular degeneration in subjects from a Northern European population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;**42**:439–46.
- 35 Loane E, Nolan JM, O'Donovan O, *et al.* Transport and retinal capture of lutein and zeaxanthin with reference to age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 2008;**53**:68–81. doi:10.1016/j.survophthal.2007.10.008
- 36 Luo J, Mills K, le Cessie S, *et al.* Ageing, age-related diseases and oxidative stress: What to do next? *Ageing Res Rev* 2020;**57**:100982. doi:10.1016/j.arr.2019.100982
- 37 Delori FC, Goger DG, Dorey CK. Age-related accumulation and spatial distribution of lipofuscin in RPE of normal subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;**42**:1855–66.
- 38 Steinberg RH. Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Doc Ophthalmol Adv Ophthalmol* 1985;**60**:327–46.

- 39 Sundelin S, Wihlmark U, Nilsson SE, *et al.* Lipofuscin accumulation in cultured retinal pigment epithelial cells reduces their phagocytic capacity. *Curr Eye Res* 1998;**17**:851–7.
- 40 Brunk UT, Wihlmark U, Wrigstad A, *et al.* Accumulation of lipofuscin within retinal pigment epithelial cells results in enhanced sensitivity to photo-oxidation. *Gerontology* 1995;**41 Suppl 2**:201–12. doi:10.1159/000213743
- 41 Beatty S, Koh H, Phil M, *et al.* The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 2000;**45**:115–34.
- 42 Antioxidant status and neovascular age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960* 1993;**111**:104–9.
- 43 Seddon JM, Ajani UA, Sperduto RD, *et al.* Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. *JAMA* 1994;**272**:1413–20.
- 44 Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960* 2001;**119**:1417–36.
- 45 Chakravarthy U, Wong TY, Fletcher A, *et al.* Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol* 2010;**10**:31. doi:10.1186/1471-2415-10-31
- 46 Cong R, Zhou B, Sun Q, *et al.* Smoking and the risk of age-related macular degeneration: a meta-analysis. *Ann Epidemiol* 2008;**18**:647–56. doi:10.1016/j.annepidem.2008.04.002
- 47 Marangon K, Herbeth B, Lecomte E, *et al.* Diet, antioxidant status, and smoking habits in French men. *Am J Clin Nutr* 1998;**67**:231–9.
- 48 Taylor HR, West S, Muñoz B, *et al.* The long-term effects of visible light on the eye. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960* 1992;**110**:99–104.
- 49 Calippe B, Augustin S, Beguier F, *et al.* Complement Factor H Inhibits CD47-Mediated Resolution of Inflammation. *Immunity* 2017;**46**:261–72. doi:10.1016/j.immuni.2017.01.006
- 50 Combadière C, Feumi C, Raoul W, *et al.* CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J Clin Invest* 2007;**117**:2920–8. doi:10.1172/JCI31692
- 51 Sennlaub F, Auvynet C, Calippe B, *et al.* 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* 2013;**5**:1775–93. doi:10.1002/emmm.201302692
- 52 Gupta N, Brown KE, Milam AH. Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2003;**76**:463–71.
- 53 Tsutsumi C, Sonoda K-H, Egashira K, *et al.* The critical role of ocular-infiltrating macrophages in the development of choroidal neovascularization. *J Leukoc Biol* 2003;**74**:25–32.
- 54 Ambati J, Anand A, Fernandez S, *et al.* An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med* 2003;**9**:1390–7. doi:10.1038/nm950
- 55 Levy O, Calippe B, Lavalette S, *et al.* Apolipoprotein E promotes subretinal mononuclear phagocyte survival and chronic inflammation in age-related macular degeneration. *EMBO Mol Med* 2015;**7**:211–26. doi:10.15252/emmm.201404524
- 56 Levy O, Lavalette S, Hu SJ, *et al.* APOE Isoforms Control Pathogenic Subretinal Inflammation in Age-Related Macular Degeneration. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2015;**35**:13568–76. doi:10.1523/JNEUROSCI.2468-15.2015
- 57 Hu SJ, Calippe B, Lavalette S, *et al.* Upregulation of P2RX7 in Cx3cr1-Deficient Mononuclear Phagocytes Leads to Increased Interleukin-1 β Secretion and Photoreceptor Neurodegeneration. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2015;**35**:6987–96. doi:10.1523/JNEUROSCI.3955-14.2015
- 58 Mathis T, Housset M, Eandi C, *et al.* Activated monocytes resist elimination by retinal pigment epithelium and downregulate their OTX2 expression via TNF- α . *Aging Cell* 2017;**16**:173–82. doi:10.1111/acel.12540

- 59 Touhami S, Beguier F, Augustin S, *et al.* Chronic exposure to tumor necrosis factor alpha induces retinal pigment epithelium cell dedifferentiation. *J Neuroinflammation* 2018;**15**:85. doi:10.1186/s12974-018-1106-8
- 60 Eandi CM, Charles Messance H, Augustin S, *et al.* Subretinal mononuclear phagocytes induce cone segment loss via IL-1 β . *eLife* 2016;**5**. doi:10.7554/eLife.16490
- 61 Age-Related Eye Disease Study Research Group, SanGiovanni JP, Chew EY, *et al.* The relationship of dietary carotenoid and vitamin A, E, and C intake with age-related macular degeneration in a case-control study: AREDS Report No. 22. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960* 2007;**125**:1225–32. doi:10.1001/archophth.125.9.1225
- 62 Chong EW-T, Kreis AJ, Wong TY, *et al.* Dietary omega-3 fatty acid and fish intake in the primary prevention of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960* 2008;**126**:826–33. doi:10.1001/archophth.126.6.826
- 63 Souied EH, Delcourt C, Querques G, *et al.* Oral docosahexaenoic acid in the prevention of exudative age-related macular degeneration: the Nutritional AMD Treatment 2 study. *Ophthalmology* 2013;**120**:1619–31. doi:10.1016/j.ophtha.2013.01.005
- 64 Rofagha S, Bhisitkul RB, Boyer DS, *et al.* Seven-Year Outcomes in Ranibizumab-Treated Patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: A Multicenter Cohort Study (SEVEN-UP). *Ophthalmology* 2013;**120**:2292–9. doi:10.1016/j.ophtha.2013.03.046
- 65 Baek SK, Kim JH, Kim JW, *et al.* Increase in the Population of Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration Who Underwent Long-Term Active Treatment. *Sci Rep* 2019;**9**:1–10. doi:10.1038/s41598-019-49749-y
- 66 Mata NL, Vogel R. Pharmacologic treatment of atrophic age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol* 2010;**21**:190–6. doi:10.1097/ICU.0b013e32833866c8
- 67 Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;**285**:1182–6. doi:10.1056/NEJM197111182852108
- 68 Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;**386**:671–4. doi:10.1038/386671a0
- 69 Hendrix MJC, Seftor EA, Hess AR, *et al.* Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 2003;**3**:411–21. doi:10.1038/nrc1092
- 70 Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, *et al.* Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;**407**:242–8. doi:10.1038/35025215
- 71 Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003;**9**:653–60. doi:10.1038/nm0603-653
- 72 Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Dev Camb Engl* 1998;**125**:1591–8.
- 73 Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;**86**:353–64. doi:10.1016/s0092-8674(00)80108-7
- 74 Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011;**473**:298–307. doi:10.1038/nature10144
- 75 Arenillas JF, Sobrino T, Castillo J, *et al.* The role of angiogenesis in damage and recovery from ischemic stroke. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2007;**9**:205–12. doi:10.1007/s11936-007-0014-5
- 76 Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, *et al.* Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 2001;**28**:131–8. doi:10.1038/88842
- 77 Bressler NM. Antiangiogenic approaches to age-related macular degeneration today. *Ophthalmology* 2009;**116**:S15-23. doi:10.1016/j.ophtha.2009.06.048
- 78 Viallard C, Larrivée B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis* 2017;**20**:409–26. doi:10.1007/s10456-017-9562-9

- 79 Guillonneau X, Eandi CM, Paques M, *et al.* On phagocytes and macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2017;**61**:98–128. doi:10.1016/j.preteyeres.2017.06.002
- 80 Green WR, Enger C. Age-related macular degeneration histopathologic studies. The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. *Ophthalmology* 1993;**100**:1519–35.
- 81 Sarks SH, Van Driel D, Maxwell L, *et al.* Softening of drusen and subretinal neovascularization. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1980;**100**:414–22.
- 82 Abokyi S, To C-H, Lam TT, *et al.* Central Role of Oxidative Stress in Age-Related Macular Degeneration: Evidence from a Review of the Molecular Mechanisms and Animal Models. *Oxid Med Cell Longev* 2020;**2020**:7901270. doi:10.1155/2020/7901270
- 83 Ross RD, Barofsky JM, Cohen G, *et al.* Presumed macular choroidal watershed vascular filling, choroidal neovascularization, and systemic vascular disease in patients with age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 1998;**125**:71–80. doi:10.1016/s0002-9394(99)80237-2
- 84 Friedman E. A hemodynamic model of the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 1997;**124**:677–82. doi:10.1016/s0002-9394(14)70906-7
- 85 Grunwald JE, Hariprasad SM, DuPont J. Effect of aging on foveolar choroidal circulation. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960* 1998;**116**:150–4. doi:10.1001/archoph.116.2.150
- 86 Claffey KP, Wilkison WO, Spiegelman BM. Vascular endothelial growth factor. Regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *J Biol Chem* 1992;**267**:16317–22.
- 87 Finkenzeller G, Marmé D, Weich HA, *et al.* Platelet-derived growth factor-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is mediated by protein kinase C. *Cancer Res* 1992;**52**:4821–3.
- 88 Fischer S, Sharma HS, Karliczek GF, *et al.* Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in pig cerebral microvascular endothelial cells and its upregulation by adenosine. *Brain Res Mol Brain Res* 1995;**28**:141–8. doi:10.1016/0169-328x(94)00193-i
- 89 Dolecki GJ, Connolly DT. Effects of a variety of cytokines and inducing agents on vascular permeability factor mRNA levels in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;**180**:572–8. doi:10.1016/s0006-291x(05)81103-9
- 90 Li J, Perrella MA, Tsai JC, *et al.* Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1995;**270**:308–12. doi:10.1074/jbc.270.1.308
- 91 Harada S, Nagy JA, Sullivan KA, *et al.* Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J Clin Invest* 1994;**93**:2490–6. doi:10.1172/JCI117258
- 92 Cullinan-Bove K, Koos RD. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology* 1993;**133**:829–37. doi:10.1210/endo.133.2.8344219
- 93 Hyder SM, Murthy L, Stancel GM. Progesterone regulation of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1998;**58**:392–5.
- 94 Williams B, Baker AQ, Gallacher B, *et al.* Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertens Dallas Tex* 1979 1995;**25**:913–7. doi:10.1161/01.hyp.25.5.913
- 95 Ladoux A, Frelin C. Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;**195**:1005–10. doi:10.1006/bbrc.1993.2144
- 96 Ishibashi T, Murata T, Hangai M, *et al.* Advanced glycation end products in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960* 1998;**116**:1629–32.
- 97 Tian SF, Toda S, Higashino H, *et al.* Glycation decreases the stability of the triple-helical strands of fibrous collagen against proteolytic degradation by pepsin in a specific temperature range. *J Biochem (Tokyo)* 1996;**120**:1153–62.
- 98 Howard EW, Benton R, Ahern-Moore J, *et al.* Cellular contraction of collagen lattices is inhibited by nonenzymatic glycation. *Exp Cell Res* 1996;**228**:132–7. doi:10.1006/excr.1996.0308

- 99 Rittié L, Berton A, Monboisse JC, *et al.* Decreased contraction of glycated collagen lattices coincides with impaired matrix metalloproteinase production. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;**264**:488–92. doi:10.1006/bbrc.1999.1519
- 100 Hammes HP, Hoerauf H, Alt A, *et al.* N(epsilon)(carboxymethyl)lysine and the AGE receptor RAGE colocalize in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;**40**:1855–9.
- 101 Lu M, Kuroki M, Amano S, *et al.* Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *J Clin Invest* 1998;**101**:1219–24. doi:10.1172/JCI1277
- 102 Ohno-Matsui K, Morita I, Tombran-Tink J, *et al.* Novel mechanism for age-related macular degeneration: an equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF. *J Cell Physiol* 2001;**189**:323–33. doi:10.1002/jcp.10026
- 103 Kuroki M, Voest EE, Amano S, *et al.* Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 1996;**98**:1667–75. doi:10.1172/JCI118962
- 104 Koch S, Tugues S, Li X, *et al.* Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J* 2011;**437**:169–83. doi:10.1042/BJ20110301
- 105 Olsson A-K, Dimberg A, Kreuger J, *et al.* VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;**7**:359–71. doi:10.1038/nrm1911
- 106 Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006;**312**:549–60. doi:10.1016/j.yexcr.2005.11.012
- 107 Djordjevic S, Driscoll PC. Targeting VEGF signalling via the neuropilin co-receptor. *Drug Discov Today* 2013;**18**:447–55. doi:10.1016/j.drudis.2012.11.013
- 108 Lal N, Puri K, Rodrigues B. Vascular Endothelial Growth Factor B and Its Signaling. *Front Cardiovasc Med* 2018;**5**. doi:10.3389/fcvm.2018.00039
- 109 Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, *et al.* Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;**246**:1306–9. doi:10.1126/science.2479986
- 110 Alon T, Hemo I, Itin A, *et al.* Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995;**1**:1024–8. doi:10.1038/nm1095-1024
- 111 Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, *et al.* Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* 1990;**50**:1774–8.
- 112 Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001;**114**:853–65.
- 113 Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;**25**:581–611. doi:10.1210/er.2003-0027
- 114 Shibuya M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *Int J Biochem Cell Biol* 2001;**33**:409–20. doi:10.1016/s1357-2725(01)00026-7
- 115 Boucher JM, Clark RP, Chong DC, *et al.* Dynamic alterations in decoy VEGF receptor-1 stability regulate angiogenesis. *Nat Commun* 2017;**8**:15699. doi:10.1038/ncomms15699
- 116 Ho VC, Fong G-H. Vasculogenesis and Angiogenesis in VEGF Receptor-1 Deficient Mice. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2015;**1332**:161–76. doi:10.1007/978-1-4939-2917-7_12
- 117 Shima DT, Adamis AP, Ferrara N, *et al.* Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. *Mol Med Camb Mass* 1995;**1**:182–93.
- 118 Adamis AP, Shima DT, Yeo KT, *et al.* Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;**193**:631–8. doi:10.1006/bbrc.1993.1671

- 119 Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995;**108** (Pt 6):2369–79.
- 120 Blaauwgeers HG, Holtkamp GM, Rutten H, *et al.* Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am J Pathol* 1999;**155**:421–8. doi:10.1016/S0002-9440(10)65138-3
- 121 Frank RN, Amin RH, Elliott D, *et al.* Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor are present in epiretinal and choroidal neovascular membranes. *Am J Ophthalmol* 1996;**122**:393–403. doi:10.1016/s0002-9394(14)72066-5
- 122 Lopez PF, Sippy BD, Lambert HM, *et al.* Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;**37**:855–68.
- 123 Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, *et al.* Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate. *Ophthalmology* 1996;**103**:1820–8. doi:10.1016/s0161-6420(96)30420-x
- 124 Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, *et al.* Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;**92**:10457–61. doi:10.1073/pnas.92.23.10457
- 125 Adamis AP, Shima DT, Tolentino MJ, *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol Chic Ill* 1960 1996;**114**:66–71. doi:10.1001/archophth.1996.01100130062010
- 126 Miller JW, Adamis AP, Shima DT, *et al.* Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol* 1994;**145**:574–84.
- 127 Zhang F, Tang Z, Hou X, *et al.* VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106**:6152–7. doi:10.1073/pnas.0813061106
- 128 Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, *et al.* Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004;**5**:74–80. doi:10.1038/ni1013
- 129 Duong T, Koltowska K, Pichol-Thievent C, *et al.* VEGFD regulates blood vascular development by modulating SOX18 activity. *Blood* 2014;**123**:1102–12. doi:10.1182/blood-2013-04-495432
- 130 Ogawa S, Oku A, Sawano A, *et al.* A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem* 1998;**273**:31273–82. doi:10.1074/jbc.273.47.31273
- 131 Yamazaki Y, Matsunaga Y, Tokunaga Y, *et al.* Snake venom Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF-Fs) exclusively vary their structures and functions among species. *J Biol Chem* 2009;**284**:9885–91. doi:10.1074/jbc.M809071200
- 132 Mesquita J, Castro-de-Sousa JP, Vaz-Pereira S, *et al.* Vascular endothelial growth factors and placenta growth factor in retinal vasculopathies: Current research and future perspectives. *Cytokine Growth Factor Rev* 2018;**39**:102–15. doi:10.1016/j.cytogfr.2017.11.005
- 133 Noma H, Funatsu H, Mimura T, *et al.* Vitreous levels of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor in macular edema with central retinal vein occlusion. *Ophthalmology* 2009;**116**:87–93. doi:10.1016/j.ophtha.2008.09.034
- 134 Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET, *et al.* Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2004;**351**:2805–16. doi:10.1056/NEJMoa042760
- 135 VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization (V.I.S.I.O.N.) Clinical Trial Group, Chakravarthy U, Adamis AP, *et al.* Year 2 efficacy results of 2 randomized controlled clinical trials of pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2006;**113**:1508.e1-25. doi:10.1016/j.ophtha.2006.02.064

- 136 Ng EWM, Adamis AP. Anti-VEGF aptamer (pegaptanib) therapy for ocular vascular diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2006;**1082**:151–71. doi:10.1196/annals.1348.062
- 137 Kodjikian L, Souied EH, Mimoun G, *et al.* Ranibizumab versus Bevacizumab for Neovascular Age-related Macular Degeneration: Results from the GEFAL Noninferiority Randomized Trial. *Ophthalmology* 2013;**120**:2300–9. doi:10.1016/j.ophtha.2013.06.020
- 138 Ferrara N, Damico L, Shams N, *et al.* Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina Phila Pa* 2006;**26**:859–70. doi:10.1097/01.iae.0000242842.14624.e7
- 139 Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, *et al.* Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006;**355**:1419–31. doi:10.1056/NEJMoa054481
- 140 Holash J, Davis S, Papadopoulos N, *et al.* VEGF-Trap: A VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**:11393–8. doi:10.1073/pnas.172398299
- 141 Heier JS, Brown DM, Chong V, *et al.* Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2012;**119**:2537–48. doi:10.1016/j.ophtha.2012.09.006
- 142 Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, *et al.* Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;**88**:9267–71. doi:10.1073/pnas.88.20.9267
- 143 Yang W, Ahn H, Hinrichs M, *et al.* Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells. *J Reprod Immunol* 2003;**60**:53–60. doi:10.1016/s0165-0378(03)00082-2
- 144 Cao Y, Ji WR, Qi P, *et al.* Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;**235**:493–8. doi:10.1006/bbrc.1997.6813
- 145 Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;**90**:10705–9. doi:10.1073/pnas.90.22.10705
- 146 Migdal M, Huppertz B, Tessler S, *et al.* Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem* 1998;**273**:22272–8. doi:10.1074/jbc.273.35.22272
- 147 Persico MG, Vincenti V, DiPalma T. Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF). *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;**237**:31–40. doi:10.1007/978-3-642-59953-8_2
- 148 Ziche M, Maglione D, Ribatti D, *et al.* Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 1997;**76**:517–31.
- 149 Yonekura H, Sakurai S, Liu X, *et al.* Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B and C expression in microvascular endothelial cells and pericytes. Implication in autocrine and paracrine regulation of angiogenesis. *J Biol Chem* 1999;**274**:35172–8. doi:10.1074/jbc.274.49.35172
- 150 Carmeliet P, Moons L, Luttun A, *et al.* Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001;**7**:575–83. doi:10.1038/87904
- 151 Schmidt T, Kharabi Masouleh B, Loges S, *et al.* Loss or inhibition of stromal-derived PlGF prolongs survival of mice with imatinib-resistant Bcr-Abl1(+) leukemia. *Cancer Cell* 2011;**19**:740–53. doi:10.1016/j.ccr.2011.05.007
- 152 Bellik L, Vinci MC, Filippi S, *et al.* Intracellular pathways triggered by the selective FLT-1-agonist placental growth factor in vascular smooth muscle cells exposed to hypoxia. *Br J Pharmacol* 2005;**146**:568–75. doi:10.1038/sj.bjp.0706347
- 153 Luttun A, Tjwa M, Moons L, *et al.* Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 2002;**8**:831–40. doi:10.1038/nm731

- 154 Rafii S, Avezilla S, Shmelkov S, *et al.* Angiogenic factors reconstitute hematopoiesis by recruiting stem cells from bone marrow microenvironment. *Ann N Y Acad Sci* 2003;**996**:49–60. doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb03232.x
- 155 Selvaraj SK, Giri RK, Perelman N, *et al.* Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. *Blood* 2003;**102**:1515–24. doi:10.1182/blood-2002-11-3423
- 156 Park JE, Chen HH, Winer J, *et al.* Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1994;**269**:25646–54.
- 157 Autiero M, Waltenberger J, Communi D, *et al.* Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003;**9**:936–43. doi:10.1038/nm884
- 158 Eriksson A, Cao R, Pawliuk R, *et al.* Placenta growth factor-1 antagonizes VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive PlGF-1/VEGF heterodimers. *Cancer Cell* 2002;**1**:99–108. doi:10.1016/s1535-6108(02)00028-4
- 159 Schomber T, Kopfstein L, Djonov V, *et al.* Placental growth factor-1 attenuates vascular endothelial growth factor-A-dependent tumor angiogenesis during beta cell carcinogenesis. *Cancer Res* 2007;**67**:10840–8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1034
- 160 Björndahl M, Cao R, Eriksson A, *et al.* Blockage of VEGF-induced angiogenesis by preventing VEGF secretion. *Circ Res* 2004;**94**:1443–50. doi:10.1161/01.RES.0000129194.61747.bf
- 161 Dewerchin M, Carmeliet P. PlGF: A Multitasking Cytokine with Disease-Restricted Activity. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;**2**. doi:10.1101/cshperspect.a011056
- 162 Miyamoto N, de Kozak Y, Jeanny JC, *et al.* Placental growth factor-1 and epithelial haemato-retinal barrier breakdown: potential implication in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetologia* 2007;**50**:461–70. doi:10.1007/s00125-006-0539-2
- 163 Kowalczyk L, Touchard E, Omri S, *et al.* Placental Growth Factor Contributes to Micro-Vascular Abnormalization and Blood-Retinal Barrier Breakdown in Diabetic Retinopathy. *PLoS ONE* 2011;**6**. doi:10.1371/journal.pone.0017462
- 164 Rakic J-M, Lambert V, Devy L, *et al.* Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;**44**:3186–93. doi:10.1167/iovs.02-1092
- 165 Huang H, Shen J, Vinore SA. Blockade of VEGFR1 and 2 suppresses pathological angiogenesis and vascular leakage in the eye. *PloS One* 2011;**6**:e21411. doi:10.1371/journal.pone.0021411
- 166 Van de Veire S, Stalmans I, Heindryckx F, *et al.* Further pharmacological and genetic evidence for the efficacy of PlGF inhibition in cancer and eye disease. *Cell* 2010;**141**:178–90. doi:10.1016/j.cell.2010.02.039
- 167 Okada-Ban M, Thiery JP, Jouanneau J. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;**32**:263–7. doi:10.1016/s1357-2725(99)00133-8
- 168 Ogata N, Matsushima M, Takada Y, *et al.* Expression of basic fibroblast growth factor mRNA in developing choroidal neovascularization. *Curr Eye Res* 1996;**15**:1008–18. doi:10.3109/02713689609017649
- 169 Soubrane G, Cohen SY, Delayre T, *et al.* Basic fibroblast growth factor experimentally induced choroidal angiogenesis in the minipig. *Curr Eye Res* 1994;**13**:183–95. doi:10.3109/02713689408995776
- 170 Kimura H, Sakamoto T, Hinton DR, *et al.* A new model of subretinal neovascularization in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;**36**:2110–9.
- 171 Tobe T, Ortega S, Luna JD, *et al.* Targeted disruption of the FGF2 gene does not prevent choroidal neovascularization in a murine model. *Am J Pathol* 1998;**153**:1641–6. doi:10.1016/S0002-9440(10)65753-7
- 172 Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;**15**:197–204. doi:10.1016/j.cytogfr.2004.03.007

- 173 Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999;**79**:1283–316. doi:10.1152/physrev.1999.79.4.1283
- 174 Bategay EJ, Rupp J, Iruela-Arispe L, *et al.* PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *J Cell Biol* 1994;**125**:917–28. doi:10.1083/jcb.125.4.917
- 175 Hellström M, Kalén M, Lindahl P, *et al.* Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Dev Camb Engl* 1999;**126**:3047–55.
- 176 Levéen P, Pekny M, Gebre-Medhin S, *et al.* Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev* 1994;**8**:1875–87. doi:10.1101/gad.8.16.1875
- 177 Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in mouse development. *Int J Dev Biol* 1995;**39**:817–25.
- 178 Sennino B, Falcón BL, McCauley D, *et al.* Sequential loss of tumor vessel pericytes and endothelial cells after inhibition of platelet-derived growth factor B by selective aptamer AX102. *Cancer Res* 2007;**67**:7358–67. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0293
- 179 Dell S, Peters S, Mütter P, *et al.* The role of PDGF receptor inhibitors and PI3-kinase signaling in the pathogenesis of corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;**47**:1928–37. doi:10.1167/iovs.05-1071
- 180 Enge M, Bjarnegård M, Gerhardt H, *et al.* Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *EMBO J* 2002;**21**:4307–16. doi:10.1093/emboj/cdf418
- 181 Jo N, Mailhos C, Ju M, *et al.* Inhibition of platelet-derived growth factor B signaling enhances the efficacy of anti-vascular endothelial growth factor therapy in multiple models of ocular neovascularization. *Am J Pathol* 2006;**168**:2036–53. doi:10.2353/ajpath.2006.050588
- 182 Jaffe GJ, Elliott D, Wells JA, *et al.* A Phase 1 Study of Intravitreal E10030 in Combination with Ranibizumab in Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology* 2016;**123**:78–85. doi:10.1016/j.ophtha.2015.09.004
- 183 Jaffe GJ, Ciulla TA, Ciardella AP, *et al.* Dual Antagonism of PDGF and VEGF in Neovascular Age-Related Macular Degeneration: A Phase IIb, Multicenter, Randomized Controlled Trial. *Ophthalmology* 2017;**124**:224–34. doi:10.1016/j.ophtha.2016.10.010
- 184 Rosenfeld PJ, Feuer WJ. Lessons from Recent Phase III Trial Failures: Don't Design Phase III Trials Based on Retrospective Subgroup Analyses from Phase II Trials. *Ophthalmology* 2018;**125**:1488–91. doi:10.1016/j.ophtha.2018.06.002
- 185 Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008;**8**:604–17. doi:10.1038/nrc2353
- 186 Friedlander M, Theesfeld CL, Sugita M, *et al.* Involvement of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in ocular neovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;**93**:9764–9. doi:10.1073/pnas.93.18.9764
- 187 Luna J, Tobe T, Mousa SA, *et al.* Antagonists of integrin alpha v beta 3 inhibit retinal neovascularization in a murine model. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 1996;**75**:563–73.
- 188 Kamizuru H, Kimura H, Yasukawa T, *et al.* Monoclonal antibody-mediated drug targeting to choroidal neovascularization in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;**42**:2664–72.
- 189 Montassar F, Darche M, Blaizot A, *et al.* Lebecetin, a C-type lectin, inhibits choroidal and retinal neovascularization. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2017;**31**:1107–19. doi:10.1096/fj.201600351R
- 190 Kim S, Bell K, Mousa SA, *et al.* Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am J Pathol* 2000;**156**:1345–62. doi:10.1016/s0002-9440(10)65005-5
- 191 Muether PS, Hermann MM, Viebahn U, *et al.* Vascular endothelial growth factor in patients with exudative age-related macular degeneration treated with ranibizumab. *Ophthalmology* 2012;**119**:2082–6. doi:10.1016/j.ophtha.2012.07.041

- 192 Umeda N, Kachi S, Akiyama H, *et al.* Suppression and regression of choroidal neovascularization by systemic administration of an alpha5beta1 integrin antagonist. *Mol Pharmacol* 2006;**69**:1820–8. doi:10.1124/mol.105.020941
- 193 Maier A-KB, Kociok N, Zahn G, *et al.* Modulation of hypoxia-induced neovascularization by JSM6427, an integrin alpha5beta1 inhibiting molecule. *Curr Eye Res* 2007;**32**:801–12. doi:10.1080/02713680701553052
- 194 Dodelet VC, Pasquale EB. Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis to tumorigenesis. *Oncogene* 2000;**19**:5614–9. doi:10.1038/sj.onc.1203856
- 195 Zhang J, Hughes S. Role of the ephrin and Eph receptor tyrosine kinase families in angiogenesis and development of the cardiovascular system. *J Pathol* 2006;**208**:453–61. doi:10.1002/path.1937
- 196 Kuijper S, Turner CJ, Adams RH. Regulation of angiogenesis by Eph-ephrin interactions. *Trends Cardiovasc Med* 2007;**17**:145–51. doi:10.1016/j.tcm.2007.03.003
- 197 Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 1998;**93**:741–53. doi:10.1016/s0092-8674(00)81436-1
- 198 Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Dev Camb Engl* 2004;**131**:965–73. doi:10.1242/dev.01074
- 199 Gridley T. Notch signaling in vascular development and physiology. *Dev Camb Engl* 2007;**134**:2709–18. doi:10.1242/dev.004184
- 200 Suchting S, Freitas C, le Noble F, *et al.* The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:3225–30. doi:10.1073/pnas.0611177104
- 201 Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, *et al.* Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* 2006;**444**:1032–7. doi:10.1038/nature05355
- 202 Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006;**25**:9–34. doi:10.1007/s10555-006-7886-9
- 203 Hoffmann S, He S, Ehren M, *et al.* MMP-2 and MMP-9 secretion by rpe is stimulated by angiogenic molecules found in choroidal neovascular membranes. *Retina Phila Pa* 2006;**26**:454–61. doi:10.1097/01.iae.0000238549.74626.33
- 204 Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med Maywood NJ* 2003;**228**:1–14. doi:10.1177/153537020322800101
- 205 Tsai JC, Song BJ, Wu L, *et al.* Erythropoietin: a candidate neuroprotective agent in the treatment of glaucoma. *J Glaucoma* 2007;**16**:567–71. doi:10.1097/IJG.0b013e318156a556
- 206 Nakano M, Satoh K, Fukumoto Y, *et al.* Important role of erythropoietin receptor to promote VEGF expression and angiogenesis in peripheral ischemia in mice. *Circ Res* 2007;**100**:662–9. doi:10.1161/01.RES.0000260179.43672.fe
- 207 Hernández C, Fonollosa A, García-Ramírez M, *et al.* Erythropoietin is expressed in the human retina and it is highly elevated in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema. *Diabetes Care* 2006;**29**:2028–33. doi:10.2337/dc06-0556
- 208 Watanabe D, Suzuma K, Matsui S, *et al.* Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 2005;**353**:782–92. doi:10.1056/NEJMoa041773
- 209 Brown MS, Barón AE, France EK, *et al.* Association between higher cumulative doses of recombinant erythropoietin and risk for retinopathy of prematurity. *J AAPOS Off Publ Am Assoc Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2006;**10**:143–9. doi:10.1016/j.jaapos.2005.09.005
- 210 Grossniklaus HE, Ling JX, Wallace TM, *et al.* Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. *Mol Vis* 2002;**8**:119–26.
- 211 Grossniklaus HE, Green WR. Choroidal neovascularization. *Am J Ophthalmol* 2004;**137**:496–503. doi:10.1016/j.ajo.2003.09.042

- 212 Dobi ET, Puliafito CA, Destro M. A new model of experimental choroidal neovascularization in the rat. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960* 1989;**107**:264–9. doi:10.1001/archopht.1989.01070010270035
- 213 Montezuma SR, Vavvas D, Miller JW. Review of the ocular angiogenesis animal models. *Semin Ophthalmol* 2009;**24**:52–61. doi:10.1080/08820530902800017
- 214 Grossniklaus HE, Kang SJ, Berglin L. Animal Models of Choroidal and Retinal Neovascularization. *Prog Retin Eye Res* 2010;**29**:500–19. doi:10.1016/j.preteyeres.2010.05.003
- 215 Liu C-H, Wang Z, Sun Y, *et al.* Animal models of ocular angiogenesis: from development to pathologies. *FASEB J* 2017;**31**:4665–81. doi:10.1096/fj.201700336R
- 216 Miller H, Miller B, Ishibashi T, *et al.* Pathogenesis of laser-induced choroidal subretinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;**31**:899–908.
- 217 Lavalette S, Raoul W, Houssier M, *et al.* Interleukin-1 β inhibition prevents choroidal neovascularization and does not exacerbate photoreceptor degeneration. *Am J Pathol* 2011;**178**:2416–23. doi:10.1016/j.ajpath.2011.01.013
- 218 Lambert V, Lecomte J, Hansen S, *et al.* Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice. *Nat Protoc* 2013;**8**:2197–211. doi:10.1038/nprot.2013.135
- 219 Sakamoto T, Sanui H, Ishibashi T, *et al.* Subretinal neovascularization in the rat induced by IRBP synthetic peptides. *Exp Eye Res* 1994;**58**:155–60. doi:10.1006/exer.1994.1003
- 220 Kiilgaard JF, Andersen MVN, Wiencke AK, *et al.* A new animal model of choroidal neovascularization. *Acta Ophthalmol Scand* 2005;**83**:697–704. doi:10.1111/j.1600-0420.2005.00566.x
- 221 Lassota N, Kiilgaard JF, la Cour M, *et al.* Natural history of choroidal neovascularization after surgical induction in an animal model. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 2008;**86**:495–503. doi:10.1111/j.1600-0420.2007.01127.x
- 222 Lassota N, Kiilgaard JF, Prause JU, *et al.* Surgical induction of choroidal neovascularization in a porcine model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 2007;**245**:1189–98. doi:10.1007/s00417-006-0518-9
- 223 Schwesinger C, Yee C, Rohan RM, *et al.* Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *Am J Pathol* 2001;**158**:1161–72. doi:10.1016/S0002-9440(10)64063-1
- 224 Elizabeth Rakoczy P, Yu MJT, Nusinowitz S, *et al.* Mouse models of age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2006;**82**:741–52. doi:10.1016/j.exer.2005.10.012
- 225 Browning AC, Gray T, Amoaku WM. Isolation, culture, and characterisation of human macular inner choroidal microvascular endothelial cells. *Br J Ophthalmol* 2005;**89**:1343–7. doi:10.1136/bjo.2004.063602
- 226 Fei P, Zaitoun I, Farnoodian M, *et al.* Expression of thrombospondin-1 modulates the angioinflammatory phenotype of choroidal endothelial cells. *PloS One* 2014;**9**:e116423. doi:10.1371/journal.pone.0116423
- 227 Stewart EA, Samaranayake GJ, Browning AC, *et al.* Comparison of choroidal and retinal endothelial cells: characteristics and response to VEGF isoforms and anti-VEGF treatments. *Exp Eye Res* 2011;**93**:761–6. doi:10.1016/j.exer.2011.09.010
- 228 Loeven MA, van Gemst JJ, Schophuizen CMS, *et al.* A Novel Choroidal Endothelial Cell Line Has a Decreased Affinity for the Age-Related Macular Degeneration-Associated Complement Factor H Variant 402H. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018;**59**:722–30. doi:10.1167/iovs.IOVS-17-22893
- 229 Shao Z, Friedlander M, Hurst CG, *et al.* Choroid Sprouting Assay: An Ex Vivo Model of Microvascular Angiogenesis. *PLOS ONE* 2013;**8**:e69552. doi:10.1371/journal.pone.0069552
- 230 Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 2014;**345**:1247125. doi:10.1126/science.1247125
- 231 Liu H, Wang Y, Cui K, *et al.* Advances in Hydrogels in Organoids and Organs-on-a-Chip. *Adv Mater Deerfield Beach Fla* 2019;**31**:e1902042. doi:10.1002/adma.201902042

- 232 Bai J, Wang C. Organoids and Microphysiological Systems: New Tools for Ophthalmic Drug Discovery. *Front Pharmacol* 2020;**11**:407. doi:10.3389/fphar.2020.00407
- 233 Missale C, Nash SR, Robinson SW, *et al.* Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 1998;**78**:189–225. doi:10.1152/physrev.1998.78.1.189
- 234 Kobilka B, Schertler GFX. New G-protein-coupled receptor crystal structures: insights and limitations. *Trends Pharmacol Sci* 2008;**29**:79–83. doi:10.1016/j.tips.2007.11.009
- 235 Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H. Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res* 2004;**24**:165–205.
- 236 Fallon JH, Moore RY. Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol* 1978;**180**:545–80. doi:10.1002/cne.901800310
- 237 Arias-Carrión O, Stamelou M, Murillo-Rodríguez E, *et al.* Dopaminergic reward system: a short integrative review. *Int Arch Med* 2010;**3**:24. doi:10.1186/1755-7682-3-24
- 238 Björklund A, Dunnett SB. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 2007;**30**:194–202. doi:10.1016/j.tins.2007.03.006
- 239 Houk JC, Wise SP. Distributed modular architectures linking basal ganglia, cerebellum, and cerebral cortex: their role in planning and controlling action. *Cereb Cortex N Y N 1991* 1995;**5**:95–110. doi:10.1093/cercor/5.2.95
- 240 Moore RY. Organization of midbrain dopamine systems and the pathophysiology of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2003;**9 Suppl 2**:S65–71. doi:10.1016/s1353-8020(03)00063-4
- 241 Nestler EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2001;**2**:119–28. doi:10.1038/35053570
- 242 Di Chiara G, Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;**85**:5274–8. doi:10.1073/pnas.85.14.5274
- 243 Phillips AG, Vacca G, Ahn S. A top-down perspective on dopamine, motivation and memory. *Pharmacol Biochem Behav* 2008;**90**:236–49. doi:10.1016/j.pbb.2007.10.014
- 244 Gudelsky GA. Tuberoinfundibular dopamine neurons and the regulation of prolactin secretion. *Psychoneuroendocrinology* 1981;**6**:3–16. doi:10.1016/0306-4530(81)90044-5
- 245 Cohen Y, Peleg E, Belkin M, *et al.* Ambient illuminance, retinal dopamine release and refractive development in chicks. *Exp Eye Res* 2012;**103**:33–40. doi:10.1016/j.exer.2012.08.004
- 246 Iuvone PM, Galli CL, Garrison-Gund CK, *et al.* Light stimulates tyrosine hydroxylase activity and dopamine synthesis in retinal amacrine neurons. *Science* 1978;**202**:901–2. doi:10.1126/science.30997
- 247 Dowling JE, Ehinger B. The interplexiform cell system. I. Synapses of the dopaminergic neurons of the goldfish retina. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1978;**201**:7–26. doi:10.1098/rspb.1978.0030
- 248 Dowling JE, Ehinger B. Synaptic organization of the dopaminergic neurons in the rabbit retina. *J Comp Neurol* 1978;**180**:203–20. doi:10.1002/cne.901800202
- 249 Frederick JM, Rayborn ME, Laties AM, *et al.* Dopaminergic neurons in the human retina. *J Comp Neurol* 1982;**210**:65–79. doi:10.1002/cne.902100108
- 250 Savy C, Martin-Martinelli E, Simon A, *et al.* Altered development of dopaminergic cells in the retina of weaver mice. *J Comp Neurol* 1999;**412**:656–68.
- 251 Ehinger B, Florén I. Quantitation of the uptake of indoleamines and dopamine in the rabbit retina. *Exp Eye Res* 1978;**26**:1–11. doi:10.1016/0014-4835(78)90147-1
- 252 Kolb H, Cuenca N, Wang HH, *et al.* The synaptic organization of the dopaminergic amacrine cell in the cat retina. *J Neurocytol* 1990;**19**:343–66. doi:10.1007/bf01188404
- 253 Dacey DM. The dopaminergic amacrine cell. *J Comp Neurol* 1990;**301**:461–89. doi:10.1002/cne.903010310

- 254 Savy C, Moussafi F, Durand J, *et al.* Distribution and spatial geometry of dopamine interplexiform cells in the retina. II. External arborizations in the adult rat and monkey. *J Comp Neurol* 1995;**355**:392–404. doi:10.1002/cne.903550306
- 255 Bjelke B, Goldstein M, Tinner B, *et al.* Dopaminergic transmission in the rat retina: evidence for volume transmission. *J Chem Neuroanat* 1996;**12**:37–50. doi:10.1016/s0891-0618(96)00176-7
- 256 Nir I, Haque R, Iuvone PM. Diurnal metabolism of dopamine in dystrophic retinas of homozygous and heterozygous retinal degeneration slow (rds) mice. *Brain Res* 2000;**884**:13–22. doi:10.1016/s0006-8993(00)02855-9
- 257 Witkovsky P, Nicholson C, Rice ME, *et al.* Extracellular dopamine concentration in the retina of the clawed frog, *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;**90**:5667–71.
- 258 Dearry A, Falardeau P, Shores C, *et al.* D2 dopamine receptors in the human retina: cloning of cDNA and localization of mRNA. *Cell Mol Neurobiol* 1991;**11**:437–53. doi:10.1007/bf00734808
- 259 Dearry A, Gingrich JA, Falardeau P, *et al.* Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* 1990;**347**:72–6. doi:10.1038/347072a0
- 260 Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd BF, *et al.* Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* 1991;**350**:614–9. doi:10.1038/350614a0
- 261 Strange PG. Antipsychotic drugs: importance of dopamine receptors for mechanisms of therapeutic actions and side effects. *Pharmacol Rev* 2001;**53**:119–33.
- 262 Malmberg A, Jackson DM, Eriksson A, *et al.* Unique binding characteristics of antipsychotic agents interacting with human dopamine D2A, D2B, and D3 receptors. *Mol Pharmacol* 1993;**43**:749–54.
- 263 Stone RA, Lin T, Laties AM, *et al.* Retinal dopamine and form-deprivation myopia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;**86**:704–6. doi:10.1073/pnas.86.2.704
- 264 Dong F, Zhi Z, Pan M, *et al.* Inhibition of experimental myopia by a dopamine agonist: different effectiveness between form deprivation and hyperopic defocus in guinea pigs. *Mol Vis* 2011;**17**:2824–34.
- 265 Iuvone PM, Tigges M, Fernandes A, *et al.* Dopamine synthesis and metabolism in rhesus monkey retina: development, aging, and the effects of monocular visual deprivation. *Vis Neurosci* 1989;**2**:465–71. doi:10.1017/s0952523800012360
- 266 McBrien NA, Gentle A. The role of visual information in the control of scleral matrix biology in myopia. *Curr Eye Res* 2001;**23**:313–9. doi:10.1076/ceyr.23.5.313.5440
- 267 Papastergiou GI, Schmid GF, Laties AM, *et al.* Induction of axial eye elongation and myopic refractive shift in one-year-old chickens. *Vision Res* 1998;**38**:1883–8. doi:10.1016/s0042-6989(97)00347-7
- 268 Mao J, Liu S, Qin W, *et al.* Levodopa inhibits the development of form-deprivation myopia in guinea pigs. *Optom Vis Sci Off Publ Am Acad Optom* 2010;**87**:53–60. doi:10.1097/OPX.0b013e3181c12b3d
- 269 Landis EG, Chrenek MA, Chakraborty R, *et al.* Increased endogenous dopamine prevents myopia in mice. *Exp Eye Res* 2020;**193**:107956. doi:10.1016/j.exer.2020.107956
- 270 Gao Q, Liu Q, Ma P, *et al.* Effects of direct intravitreal dopamine injections on the development of lid-suture induced myopia in rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 2006;**244**:1329–35. doi:10.1007/s00417-006-0254-1
- 271 Guggenheim JA, Northstone K, McMahon G, *et al.* Time outdoors and physical activity as predictors of incident myopia in childhood: a prospective cohort study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;**53**:2856–65. doi:10.1167/iovs.11-9091
- 272 Rose KA, Morgan IG, Ip J, *et al.* Outdoor activity reduces the prevalence of myopia in children. *Ophthalmology* 2008;**115**:1279–85. doi:10.1016/j.ophtha.2007.12.019
- 273 Sherwin JC, Reacher MH, Keogh RH, *et al.* The association between time spent outdoors and myopia in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* 2012;**119**:2141–51. doi:10.1016/j.ophtha.2012.04.020

- 274 Ashby RS, Schaeffel F. The effect of bright light on lens compensation in chicks. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;**51**:5247–53. doi:10.1167/iops.09-4689
- 275 Lan W, Feldkaemper M, Schaeffel F. Intermittent episodes of bright light suppress myopia in the chicken more than continuous bright light. *PLoS One* 2014;**9**:e110906. doi:10.1371/journal.pone.0110906
- 276 Smith EL, Hung L-F, Huang J. Protective effects of high ambient lighting on the development of form-deprivation myopia in rhesus monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;**53**:421–8. doi:10.1167/iops.11-8652
- 277 Zhou X, Pardue MT, Iuvone PM, *et al.* Dopamine signaling and myopia development: What are the key challenges. *Prog Retin Eye Res* 2017;**61**:60–71. doi:10.1016/j.preteyeres.2017.06.003
- 278 Seko Y, Tanaka Y, Tokoro T. Apomorphine inhibits the growth-stimulating effect of retinal pigment epithelium on scleral cells in vitro. *Cell Biochem Funct* 1997;**15**:191–6. doi:10.1002/(SICI)1099-0844(199709)15:3<191::AID-CBF738>3.0.CO;2-2
- 279 Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, *et al.* Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2014;**71**:2997–3025. doi:10.1007/s00018-014-1579-2
- 280 Dubocovich ML. Characterization of a retinal melatonin receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 1985;**234**:395–401.
- 281 Doyle SE, Grace MS, McIvor W, *et al.* Circadian rhythms of dopamine in mouse retina: the role of melatonin. *Vis Neurosci* 2002;**19**:593–601. doi:10.1017/s0952523802195058
- 282 Tosini G, Pozdeyev N, Sakamoto K, *et al.* The circadian clock system in the mammalian retina. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol* 2008;**30**:624–33. doi:10.1002/bies.20777
- 283 Tosini G, Baba K, Hwang CK, *et al.* Melatonin: an underappreciated player in retinal physiology and pathophysiology. *Exp Eye Res* 2012;**103**:82–9. doi:10.1016/j.exer.2012.08.009
- 284 Reiter RJ, Tan D-X, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res* 2010;**181**:127–51. doi:10.1016/S0079-6123(08)81008-4
- 285 Ko GY-P. Circadian regulation in the retina: From molecules to network. *Eur J Neurosci* 2020;**51**:194–216. doi:10.1111/ejn.14185
- 286 Fujieda H, Scher J, Hamadanizadeh SA, *et al.* Dopaminergic and GABAergic amacrine cells are direct targets of melatonin: immunocytochemical study of mt1 melatonin receptor in guinea pig retina. *Vis Neurosci* 2000;**17**:63–70. doi:10.1017/s0952523800171068
- 287 Nguyen-Legros J, Chanut E, Versaux-Botteri C, *et al.* Dopamine inhibits melatonin synthesis in photoreceptor cells through a D2-like receptor subtype in the rat retina: biochemical and histochemical evidence. *J Neurochem* 1996;**67**:2514–20. doi:10.1046/j.1471-4159.1996.67062514.x
- 288 Adachi A, Nogi T, Ebihara S. Phase-relationship and mutual effects between circadian rhythms of ocular melatonin and dopamine in the pigeon. *Brain Res* 1998;**792**:361–9. doi:10.1016/s0006-8993(98)00206-6
- 289 Dubocovich ML. Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature* 1983;**306**:782–4. doi:10.1038/306782a0
- 290 Jackson CR, Ruan G-X, Aseem F, *et al.* Retinal dopamine mediates multiple dimensions of light-adapted vision. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2012;**32**:9359–68. doi:10.1523/JNEUROSCI.0711-12.2012
- 291 Bloomfield SA, Dacheux RF. Rod vision: pathways and processing in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res* 2001;**20**:351–84. doi:10.1016/s1350-9462(00)00031-8
- 292 Hornstein EP, Verweij J, Li PH, *et al.* Gap-junctional coupling and absolute sensitivity of photoreceptors in macaque retina. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2005;**25**:11201–9. doi:10.1523/JNEUROSCI.3416-05.2005
- 293 Ribelayga C, Cao Y, Mangel SC. The circadian clock in the retina controls rod-cone coupling. *Neuron* 2008;**59**:790–801. doi:10.1016/j.neuron.2008.07.017
- 294 Zhang Z, Li H, Liu X, *et al.* Circadian clock control of connexin36 phosphorylation in retinal photoreceptors of the CBA/CaJ mouse strain. *Vis Neurosci* 2015;**32**:E009. doi:10.1017/S0952523815000061

- 295 McMahon DG, Iuvone PM, Tosini G. Circadian organization of the mammalian retina: from gene regulation to physiology and diseases. *Prog Retin Eye Res* 2014;**39**:58–76. doi:10.1016/j.preteyeres.2013.12.001
- 296 Jin NG, Chuang AZ, Masson PJ, *et al.* Rod electrical coupling is controlled by a circadian clock and dopamine in mouse retina. *J Physiol* 2015;**593**:1597–631. doi:10.1113/jphysiol.2014.284919
- 297 Hampson EC, Vaney DI, Weiler R. Dopaminergic modulation of gap junction permeability between amacrine cells in mammalian retina. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 1992;**12**:4911–22.
- 298 Witkovsky P. Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol Adv Ophthalmol* 2004;**108**:17–40. doi:10.1023/b:doop.0000019487.88486.0a
- 299 Oliver P, Jolicœur FB, Lafond G, *et al.* Effects of retinal dopamine depletion on the rabbit electroretinogram. *Doc Ophthalmol Adv Ophthalmol* 1987;**66**:359–71. doi:10.1007/bf00213664
- 300 Schneider T, Zrenner E. Effects of D-1 and D-2 dopamine antagonists on ERG and optic nerve response of the cat. *Exp Eye Res* 1991;**52**:425–30. doi:10.1016/0014-4835(91)90038-g
- 301 Young RW. The renewal of photoreceptor cell outer segments. *J Cell Biol* 1967;**33**:61–72.
- 302 Boesze-Battaglia K, Goldberg AFX. Photoreceptor renewal: a role for peripherin/rds. *Int Rev Cytol* 2002;**217**:183–225.
- 303 Kevany BM, Palczewski K. Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors. *Physiol Bethesda Md* 2010;**25**:8–15. doi:10.1152/physiol.00038.2009
- 304 Edwards RB, Flaherty PM. Association of changes in intracellular cyclic AMP with changes in phagocytosis in cultured rat pigment epithelium. *Curr Eye Res* 1986;**5**:19–26. doi:10.3109/02713688608995161
- 305 Masri H, Goureau O, Hecquet C, *et al.* [Dopamine slows phagocytosis of rods from bovine pigment epithelium in vitro through D1 receptor]. *C R Acad Sci III* 1996;**319**:687–91.
- 306 de Lau LML, Breteler MMB. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006;**5**:525–35. doi:10.1016/S1474-4422(06)70471-9
- 307 Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2002;**14**:223–36; discussion 222. doi:10.1176/jnp.14.2.223
- 308 Tarakad A, Jankovic J. Diagnosis and Management of Parkinson's Disease. *Semin Neurol* 2017;**37**:118–26. doi:10.1055/s-0037-1601888
- 309 Seifert KD, Wiener JJ. The impact of DaTscan on the diagnosis and management of movement disorders: A retrospective study. *Am J Neurodegener Dis* 2013;**2**:29–34.
- 310 Armstrong RA. Oculo-Visual Dysfunction in Parkinson's Disease. *J Park Dis* 2015;**5**:715–26. doi:10.3233/JPD-150686
- 311 Chan F, Armstrong IT, Pari G, *et al.* Deficits in saccadic eye-movement control in Parkinson's disease. *Neuropsychologia* 2005;**43**:784–96. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2004.06.026
- 312 Mathis T, Rauber H, Sautivet L, *et al.* [Screening for reading difficulties in Parkinson's disease: An evaluation of the Alouette test]. *J Fr Ophtalmol* Published Online First: 24 August 2018. doi:10.1016/j.jfo.2018.01.013
- 313 Hardy J, Cai H, Cookson MR, *et al.* Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. *Ann Neurol* 2006;**60**:389–98. doi:10.1002/ana.21022
- 314 Ascherio A, Chen H, Weisskopf MG, *et al.* Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2006;**60**:197–203. doi:10.1002/ana.20904
- 315 Migliore L, Coppedè F. Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. *Mutat Res* 2009;**667**:82–97. doi:10.1016/j.mrfmmm.2008.10.011
- 316 Lannuzel A, Höglinger GU, Champy P, *et al.* Is atypical parkinsonism in the Caribbean caused by the consumption of Annonaceae? *J Neural Transm Suppl* 2006;**153**:7. doi:10.1007/978-3-211-45295-0_24

- 317 Cox PA, Sacks OW. Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. *Neurology* 2002;**58**:956–9. doi:10.1212/wnl.58.6.956
- 318 Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, *et al.* Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983;**219**:979–80. doi:10.1126/science.6823561
- 319 Langston JW, Irwin I, Langston EB, *et al.* 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neurosci Lett* 1984;**48**:87–92. doi:10.1016/0304-3940(84)90293-3
- 320 Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, *et al.* Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett* 1998;**251**:205–8. doi:10.1016/s0304-3940(98)00504-7
- 321 Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 1988;**8**:2804–15.
- 322 George JM, Jin H, Woods WS, *et al.* Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* 1995;**15**:361–72. doi:10.1016/0896-6273(95)90040-3
- 323 Chandra S, Gallardo G, Fernández-Chacón R, *et al.* Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 2005;**123**:383–96. doi:10.1016/j.cell.2005.09.028
- 324 Bellucci A, Zaltieri M, Navarria L, *et al.* From α -synuclein to synaptic dysfunctions: new insights into the pathophysiology of Parkinson's disease. *Brain Res* 2012;**1476**:183–202. doi:10.1016/j.brainres.2012.04.014
- 325 Sidhu A, Wersinger C, Vernier P. alpha-Synuclein regulation of the dopaminergic transporter: a possible role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *FEBS Lett* 2004;**565**:1–5. doi:10.1016/j.febslet.2004.03.063
- 326 Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, *et al.* Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997;**388**:839–40. doi:10.1038/42166
- 327 Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med* 2004;**10**:1055–63. doi:10.1038/nm1113
- 328 Halliday GM, Li YW, Blumbergs PC, *et al.* Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1990;**27**:373–85. doi:10.1002/ana.410270405
- 329 Jellinger KA. Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol* 1991;**14**:153–97. doi:10.1007/bf03159935
- 330 Scherman D, Desnos C, Darchen F, *et al.* Striatal dopamine deficiency in Parkinson's disease: role of aging. *Ann Neurol* 1989;**26**:551–7. doi:10.1002/ana.410260409
- 331 Riederer P, Wuketich S. Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *J Neural Transm* 1976;**38**:277–301. doi:10.1007/bf01249445
- 332 Damier P, Hirsch EC, Agid Y, *et al.* The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain J Neurol* 1999;**122** (Pt 8):1437–48. doi:10.1093/brain/122.8.1437
- 333 Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 1988;**334**:345–8. doi:10.1038/334345a0
- 334 Scatton B, Rouquier L, Javoy-Agid F, *et al.* Dopamine deficiency in the cerebral cortex in Parkinson disease. *Neurology* 1982;**32**:1039–40. doi:10.1212/wnl.32.9.1039
- 335 Javoy-Agid F, Agid Y. Is the mesocortical dopaminergic system involved in Parkinson disease? *Neurology* 1980;**30**:1326–30. doi:10.1212/wnl.30.12.1326
- 336 Cash R, Dennis T, L'Heureux R, *et al.* Parkinson's disease and dementia: norepinephrine and dopamine in locus ceruleus. *Neurology* 1987;**37**:42–6. doi:10.1212/wnl.37.1.42
- 337 Halliday GM, Blumbergs PC, Cotton RG, *et al.* Loss of brainstem serotonin- and substance P-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain Res* 1990;**510**:104–7. doi:10.1016/0006-8993(90)90733-r

- 338 Dutton J, Copeland LG, Playfer JR, *et al.* Measuring L-dopa in plasma and urine to monitor therapy of elderly patients with Parkinson disease treated with L-dopa and a dopa decarboxylase inhibitor. *Clin Chem* 1993;**39**:629–34.
- 339 Nutt JG, Woodward WR, Anderson JL. The effect of carbidopa on the pharmacokinetics of intravenously administered levodopa: the mechanism of action in the treatment of parkinsonism. *Ann Neurol* 1985;**18**:537–43. doi:10.1002/ana.410180505
- 340 Rose S, Jenner P, Marsden CD. Chronic administration does not alter the accumulation of L-dopa into muscle. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 1994;**9**:167–72. doi:10.1002/mds.870090207
- 341 Lovenberg W, Weissbach H, Udenfriend S. Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J Biol Chem* 1962;**237**:89–93.
- 342 Schneider F, Erisson L, Beygi H, *et al.* Pharmacokinetics, metabolism and safety of deuterated L-DOPA (SD-1077)/carbidopa compared to L-DOPA/carbidopa following single oral dose administration in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2018;**84**:2422–32. doi:10.1111/bcp.13702
- 343 Tambasco N, Romoli M, Calabresi P. Levodopa in Parkinson's Disease: Current Status and Future Developments. *Curr Neuroparmacol* 2018;**16**:1239–52. doi:10.2174/1570159X15666170510143821
- 344 Nagatsua T, Sawadab M. L-dopa therapy for Parkinson's disease: past, present, and future. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;**15 Suppl 1**:S3-8. doi:10.1016/S1353-8020(09)70004-5
- 345 Bergman H, Wichmann T, Karmon B, *et al.* The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol* 1994;**72**:507–20. doi:10.1152/jn.1994.72.2.507
- 346 Kreiss DS, Mastropietro CW, Rawji SS, *et al.* The response of subthalamic nucleus neurons to dopamine receptor stimulation in a rodent model of Parkinson's disease. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 1997;**17**:6807–19.
- 347 Benazzouz A, Gross C, Féger J, *et al.* Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *Eur J Neurosci* 1993;**5**:382–9. doi:10.1111/j.1460-9568.1993.tb00505.x
- 348 Limousin P, Krack P, Pollak P, *et al.* Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 1998;**339**:1105–11. doi:10.1056/NEJM199810153391603
- 349 Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 1968;**5**:107–10. doi:10.1016/0014-2999(68)90164-7
- 350 Blum D, Torch S, Lambeng N, *et al.* Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2001;**65**:135–72. doi:10.1016/s0301-0082(01)00003-x
- 351 Sakai K, Gash DM. Effect of bilateral 6-OHDA lesions of the substantia nigra on locomotor activity in the rat. *Brain Res* 1994;**633**:144–50. doi:10.1016/0006-8993(94)91533-4
- 352 Amalric M, Moukhles H, Nieoullon A, *et al.* Complex deficits on reaction time performance following bilateral intrastratial 6-OHDA infusion in the rat. *Eur J Neurosci* 1995;**7**:972–80. doi:10.1111/j.1460-9568.1995.tb01085.x
- 353 Paillé V, Henry V, Lescaudron L, *et al.* Rat model of Parkinson's disease with bilateral motor abnormalities, reversible with levodopa, and dyskinesias. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 2007;**22**:533–9. doi:10.1002/mds.21308
- 354 Luthman J, Fredriksson A, Lewander T, *et al.* Effects of d-amphetamine and methylphenidate on hyperactivity produced by neonatal 6-hydroxydopamine treatment. *Psychopharmacology (Berl)* 1989;**99**:550–7. doi:10.1007/bf00589907
- 355 Mazzio EA, Reams RR, Soliman KFA. The role of oxidative stress, impaired glycolysis and mitochondrial respiratory redox failure in the cytotoxic effects of 6-hydroxydopamine in vitro. *Brain Res* 2004;**1004**:29–44. doi:10.1016/j.brainres.2003.12.034
- 356 Kunikowska G, Jenner P. 6-Hydroxydopamine-lesioning of the nigrostriatal pathway in rats alters basal ganglia mRNA for copper, zinc- and manganese-superoxide dismutase, but not glutathione peroxidase. *Brain Res* 2001;**922**:51–64. doi:10.1016/s0006-8993(01)03149-3

- 357 Oestreicher E, Sengstock GJ, Riederer P, *et al.* Degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons increases iron within the substantia nigra: a histochemical and neurochemical study. *Brain Res* 1994;**660**:8–18. doi:10.1016/0006-8993(94)90833-8
- 358 Glinka Y, Gassen M, Youdim MB. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl* 1997;**50**:55–66. doi:10.1007/978-3-7091-6842-4_7
- 359 Jenner P. Clues to the mechanism underlying dopamine cell death in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989;**Suppl**:22–8. doi:10.1136/jnnp.52.suppl.22
- 360 Carman LS, Gage FH, Shults CW. Partial lesion of the substantia nigra: relation between extent of lesion and rotational behavior. *Brain Res* 1991;**553**:275–83. doi:10.1016/0006-8993(91)90835-j
- 361 Jeon BS, Jackson-Lewis V, Burke RE. 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegener J Neurodegener Disord Neuroprotection Neuroregeneration* 1995;**4**:131–7. doi:10.1006/neur.1995.0016
- 362 Zuch CL, Nordstroem VK, Briedrick LA, *et al.* Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion. *J Comp Neurol* 2000;**427**:440–54. doi:10.1002/1096-9861(20001120)427:3<440::aid-cne10>3.0.co;2-7
- 363 Cenci MA, Whishaw IQ, Schallert T. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci* 2002;**3**:574–9. doi:10.1038/nrn877
- 364 Simola N, Morelli M, Carta AR. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 2007;**11**:151–67. doi:10.1007/BF03033565
- 365 Davis GC, Williams AC, Markey SP, *et al.* Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res* 1979;**1**:249–54. doi:10.1016/0165-1781(79)90006-4
- 366 Langston JW, Forno LS, Tetud J, *et al.* Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* 1999;**46**:598–605. doi:10.1002/1531-8249(199910)46:4<598::aid-ana7>3.0.co;2-f
- 367 Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, *et al.* A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;**80**:4546–50. doi:10.1073/pnas.80.14.4546
- 368 Jenner P, Rupniak NM, Rose S, *et al.* 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in the common marmoset. *Neurosci Lett* 1984;**50**:85–90. doi:10.1016/0304-3940(84)90467-1
- 369 Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS, *et al.* Differences in the metabolism of MPTP in the rodent and primate parallel differences in sensitivity to its neurotoxic effects. *Life Sci* 1985;**36**:219–24. doi:10.1016/0024-3205(85)90062-1
- 370 Sonsalla PK, Heikkila RE. Neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and methamphetamine in several strains of mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1988;**12**:345–54. doi:10.1016/0278-5846(88)90054-1
- 371 Riachi NJ, LaManna JC, Harik SI. Entry of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine into the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;**249**:744–8.
- 372 Chiba K, Trevor A, Castagnoli N. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;**120**:574–8. doi:10.1016/0006-291x(84)91293-2
- 373 Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, *et al.* Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;**82**:2173–7. doi:10.1073/pnas.82.7.2173
- 374 Ramsay RR, Singer TP. Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J Biol Chem* 1986;**261**:7585–7.
- 375 Jackson-Lewis V, Jakowec M, Burke RE, *et al.* Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegener J Neurodegener Disord Neuroprotection Neuroregeneration* 1995;**4**:257–69. doi:10.1016/1055-8330(95)90015-2

- 376 Tatton NA, Kish SJ. In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. *Neuroscience* 1997;**77**:1037–48. doi:10.1016/s0306-4522(96)00545-3
- 377 Liu Y, Roghani A, Edwards RH. Gene transfer of a reserpine-sensitive mechanism of resistance to N-methyl-4-phenylpyridinium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;**89**:9074–8. doi:10.1073/pnas.89.19.9074
- 378 Cohen G. Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology* 1984;**5**:77–82.
- 379 Philippens IHCHM. Refinement of the MPTP model for Parkinson's disease in the marmoset. *Drug Discov Today Dis Models* 2017;**25–26**:53–61. doi:10.1016/j.ddmod.2018.10.003
- 380 Jackson-Lewis V, Przedborski S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nat Protoc* 2007;**2**:141–51. doi:10.1038/nprot.2006.342
- 381 Miller DB, Ali SF, O'Callaghan JP, *et al.* The impact of gender and estrogen on striatal dopaminergic neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 1998;**844**:153–65.
- 382 Lau Y-S, Meredith GE. From drugs of abuse to parkinsonism. The MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Methods Mol Med* 2003;**79**:103–16. doi:10.1385/1-59259-358-5:103
- 383 Pothakos K, Kurz MJ, Lau Y-S. Restorative effect of endurance exercise on behavioral deficits in the chronic mouse model of Parkinson's disease with severe neurodegeneration. *BMC Neurosci* 2009;**10**:6. doi:10.1186/1471-2202-10-6
- 384 Meredith GE, Totterdell S, Petroske E, *et al.* Lysosomal malfunction accompanies alpha-synuclein aggregation in a progressive mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res* 2002;**956**:156–65. doi:10.1016/s0006-8993(02)03514-x
- 385 Fornai F, Schlüter OM, Lenzi P, *et al.* Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**:3413–8. doi:10.1073/pnas.0409713102
- 386 Shimoji M, Zhang L, Mandir AS, *et al.* Absence of inclusion body formation in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;**134**:103–8. doi:10.1016/j.molbrainres.2005.01.012
- 387 Sedelis M, Schwarting RK, Huston JP. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 2001;**125**:109–25. doi:10.1016/s0166-4328(01)00309-6
- 388 Colotla VA, Flores E, Ocos A, *et al.* Effects of MPTP on locomotor activity in mice. *Neurotoxicol Teratol* 1990;**12**:405–7. doi:10.1016/0892-0362(90)90061-g
- 389 Petroske E, Meredith GE, Callen S, *et al.* Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment. *Neuroscience* 2001;**106**:589–601. doi:10.1016/s0306-4522(01)00295-0
- 390 Luchtman DW, Shao D, Song C. Behavior, neurotransmitters and inflammation in three regimens of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Physiol Behav* 2009;**98**:130–8. doi:10.1016/j.physbeh.2009.04.021
- 391 Mizuno Y, Suzuki K, Sone N, *et al.* Inhibition of mitochondrial respiration by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mouse brain in vivo. *Neurosci Lett* 1988;**91**:349–53. doi:10.1016/0304-3940(88)90705-7
- 392 Przedborski S, Kostic V, Jackson-Lewis V, *et al.* Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity are resistant to N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 1992;**12**:1658–67.
- 393 Turmel H, Hartmann A, Parain K, *et al.* Caspase-3 activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 2001;**16**:185–9. doi:10.1002/mds.1037
- 394 Duty S, Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol* 2011;**164**:1357–91. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01426.x

- 395 Lee MK, Stirling W, Xu Y, *et al.* Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**:8968–73. doi:10.1073/pnas.132197599
- 396 Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, *et al.* Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 2000;**25**:239–52. doi:10.1016/s0896-6273(00)80886-7
- 397 Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, *et al.* Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron* 2002;**34**:521–33. doi:10.1016/s0896-6273(02)00682-7
- 398 van der Putten H, Wiederhold KH, Probst A, *et al.* Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2000;**20**:6021–9.
- 399 Lo Bianco C, Ridet J-L, Schneider BL, *et al.* alpha -Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**:10813–8. doi:10.1073/pnas.152339799
- 400 Bertrand J-A, Bedetti C, Postuma RB, *et al.* Color discrimination deficits in Parkinson's disease are related to cognitive impairment and white-matter alterations. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 2012;**27**:1781–8. doi:10.1002/mds.25272
- 401 Nguyen-Legros J. Functional neuroarchitecture of the retina: hypothesis on the dysfunction of retinal dopaminergic circuitry in Parkinson's disease. *Surg Radiol Anat SRA* 1988;**10**:137–44.
- 402 Cuenca N, Herrero M-T, Angulo A, *et al.* Morphological impairments in retinal neurons of the scotopic visual pathway in a monkey model of Parkinson's disease. *J Comp Neurol* 2005;**493**:261–73. doi:10.1002/cne.20761
- 403 Tatton WG, Kwan MM, Verrier MC, *et al.* MPTP produces reversible disappearance of tyrosine hydroxylase-containing retinal amacrine cells. *Brain Res* 1990;**527**:21–31. doi:10.1016/0006-8993(90)91056-m
- 404 Wong C, Ishibashi T, Tucker G, *et al.* Responses of the pigmented rabbit retina to NMPTP, a chemical inducer of parkinsonism. *Exp Eye Res* 1985;**40**:509–19. doi:10.1016/0014-4835(85)90073-9
- 405 Harnois C, Di Paolo T. Decreased dopamine in the retinas of patients with Parkinson's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;**31**:2473–5.
- 406 Gottlob I, Schneider E, Heider W, *et al.* Alteration of visual evoked potentials and electroretinograms in Parkinson's disease. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1987;**66**:349–57. doi:10.1016/0013-4694(87)90032-0
- 407 Ikeda H, Head GM, K. Ellis CJ. Electrophysiological signs of retinal dopamine deficiency in recently diagnosed Parkinson's disease and a follow up study. *Vision Res* 1994;**34**:2629–38. doi:10.1016/0042-6989(94)90248-8
- 408 Nowacka B, Lubiński W, Honczarenko K, *et al.* Bioelectrical function and structural assessment of the retina in patients with early stages of Parkinson's disease (PD). *Doc Ophthalmol Adv Ophthalmol* 2015;**131**:95–104. doi:10.1007/s10633-015-9503-0
- 409 Nightingale S, Mitchell KW, Howe JW. Visual evoked cortical potentials and pattern electroretinograms in Parkinson's disease and control subjects. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1986;**49**:1280–7. doi:10.1136/jnnp.49.11.1280
- 410 Peppe A, Stanzione P, Pierelli F, *et al.* Visual alterations in de novo Parkinson's disease: pattern electroretinogram latencies are more delayed and more reversible by levodopa than are visual evoked potentials. *Neurology* 1995;**45**:1144–8. doi:10.1212/wnl.45.6.1144
- 411 Chorostecki J, Seraji-Bozorgzad N, Shah A, *et al.* Characterization of retinal architecture in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2015;**355**:44–8. doi:10.1016/j.jns.2015.05.007
- 412 Aaker GD, Myung JS, Ehrlich JR, *et al.* Detection of retinal changes in Parkinson's disease with spectral-domain optical coherence tomography. *Clin Ophthalmol Auckl NZ* 2010;**4**:1427–32. doi:10.2147/OPTH.S15136
- 413 Altıntaş O, Işeri P, Ozkan B, *et al.* Correlation between retinal morphological and functional findings and clinical severity in Parkinson's disease. *Doc Ophthalmol Adv Ophthalmol* 2008;**116**:137–46. doi:10.1007/s10633-007-9091-8

- 414 Lee J-Y, Ahn J, Kim TW, *et al.* Optical coherence tomography in Parkinson's disease: is the retina a biomarker? *J Park Dis* 2014;**4**:197–204. doi:10.3233/JPD-130306
- 415 London A, Benhar I, Schwartz M. The retina as a window to the brain—from eye research to CNS disorders. *Nat Rev Neurol* 2013;**9**:44–53. doi:10.1038/nrneurol.2012.227
- 416 Adam CR, Shrier E, Ding Y, *et al.* Correlation of inner retinal thickness evaluated by spectral-domain optical coherence tomography and contrast sensitivity in Parkinson disease. *J Neuro-Ophthalmol Off J North Am Neuro-Ophthalmol Soc* 2013;**33**:137–42. doi:10.1097/WNO.0b013e31828c4e1a
- 417 Lee J-Y, Kim JM, Ahn J, *et al.* Retinal nerve fiber layer thickness and visual hallucinations in Parkinson's Disease. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 2014;**29**:61–7. doi:10.1002/mds.25543
- 418 Bodis-Wollner I, Miri S, Glazman S. Venturing into the no-man's land of the retina in Parkinson's disease. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 2014;**29**:15–22. doi:10.1002/mds.25741
- 419 Garcia-Martin E, Larrosa JM, Polo V, *et al.* Distribution of retinal layer atrophy in patients with Parkinson disease and association with disease severity and duration. *Am J Ophthalmol* 2014;**157**:470–478.e2. doi:10.1016/j.ajo.2013.09.028
- 420 Ahn J, Lee J-Y, Kim TW, *et al.* Retinal thinning associates with nigral dopaminergic loss in de novo Parkinson disease. *Neurology* 2018;**91**:e1003–12. doi:10.1212/WNL.0000000000006157
- 421 Satue M, Rodrigo MJ, Obis J, *et al.* Evaluation of Progressive Visual Dysfunction and Retinal Degeneration in Patients With Parkinson's Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;**58**:1151–7. doi:10.1167/iovs.16-20460
- 422 Jindahra P, Petrie A, Plant GT. Retrograde trans-synaptic retinal ganglion cell loss identified by optical coherence tomography. *Brain J Neurol* 2009;**132**:628–34. doi:10.1093/brain/awp001
- 423 Mahlknecht P, Seppi K, Poewe W. The Concept of Prodromal Parkinson's Disease. *J Park Dis* 2015;**5**:681–97. doi:10.3233/JPD-150685
- 424 Normando EM, Davis BM, De Groef L, *et al.* The retina as an early biomarker of neurodegeneration in a rotenone-induced model of Parkinson's disease: evidence for a neuroprotective effect of rosiglitazone in the eye and brain. *Acta Neuropathol Commun* 2016;**4**:86. doi:10.1186/s40478-016-0346-z
- 425 Satue M, Obis J, Rodrigo MJ, *et al.* Optical Coherence Tomography as a Biomarker for Diagnosis, Progression, and Prognosis of Neurodegenerative Diseases. *J Ophthalmol* 2016;**2016**. doi:10.1155/2016/8503859
- 426 Doustar J, Torbati T, Black KL, *et al.* Optical Coherence Tomography in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Diseases. *Front Neurol* 2017;**8**. doi:10.3389/fneur.2017.00701
- 427 Ortuño-Lizarán I, Beach TG, Serrano GE, *et al.* Phosphorylated α -synuclein in the retina is a biomarker of Parkinson's disease pathology severity. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 2018;**33**:1315–24. doi:10.1002/mds.27392
- 428 Beach TG, Carew J, Serrano G, *et al.* Phosphorylated α -synuclein-immunoreactive retinal neuronal elements in Parkinson's disease subjects. *Neurosci Lett* 2014;**571**:34–8. doi:10.1016/j.neulet.2014.04.027
- 429 Bodis-Wollner I, Kozlowski PB, Glazman S, *et al.* α -synuclein in the inner retina in parkinson disease. *Ann Neurol* 2014;**75**:964–6. doi:10.1002/ana.24182
- 430 Ho C-Y, Troncoso JC, Knox D, *et al.* Beta-amyloid, phospho-tau and alpha-synuclein deposits similar to those in the brain are not identified in the eyes of Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *Brain Pathol Zurich Switz* 2014;**24**:25–32. doi:10.1111/bpa.12070
- 431 Leger F, Fernagut P-O, Canon M-H, *et al.* Protein aggregation in the aging retina. *J Neuropathol Exp Neurol* 2011;**70**:63–8. doi:10.1097/NEN.0b013e31820376cc
- 432 Martínez-Navarrete GC, Martín-Nieto J, Esteve-Rudd J, *et al.* α -Synuclein gene expression profile in the retina of vertebrates. *Mol Vis* 2007;**13**:949–61.
- 433 Eschbach J, Danzer KM. α -Synuclein in Parkinson's disease: pathogenic function and translation into animal models. *Neurodegener Dis* 2014;**14**:1–17. doi:10.1159/000354615

- 434 Veys L, Vandenabeele M, Ortuño-Lizarán I, *et al.* Retinal α -synuclein deposits in Parkinson's disease patients and animal models. *Acta Neuropathol (Berl)* 2019;**137**:379–95. doi:10.1007/s00401-018-01956-z
- 435 Beguier F, Housset M, Roubéix C, *et al.* The 10q26 Risk Haplotype of Age-Related Macular Degeneration Aggravates Subretinal Inflammation by Impairing Monocyte Elimination. *Immunity* 2020;**53**:429–441.e8. doi:10.1016/j.immuni.2020.07.021
- 436 Louveau A, Harris TH, Kipnis J. Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. *Trends Immunol* 2015;**36**:569–77. doi:10.1016/j.it.2015.08.006
- 437 Li Q, Barres BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 2018;**18**:225–42. doi:10.1038/nri.2017.125
- 438 Sochocka M, Diniz BS, Leszek J. Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Mol Neurobiol* 2017;**54**:8071–89. doi:10.1007/s12035-016-0297-1
- 439 Troncoso-Escudero P, Parra A, Nassif M, *et al.* Outside in: Unraveling the Role of Neuroinflammation in the Progression of Parkinson's Disease. *Front Neurol* 2018;**9**:860. doi:10.3389/fneur.2018.00860
- 440 Jellinger KA. Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *J Cell Mol Med* 2010;**14**:457–87. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01010.x
- 441 Cebrián C, Loike JD, Sulzer D. Neuroinflammation in Parkinson's disease animal models: a cell stress response or a step in neurodegeneration? *Curr Top Behav Neurosci* 2015;**22**:237–70. doi:10.1007/7854_2014_356
- 442 Hunter RL, Dragicevic N, Seifert K, *et al.* Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system. *J Neurochem* 2007;**100**:1375–86. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04327.x
- 443 Roodveldt C, Labrador-Garrido A, Gonzalez-Rey E, *et al.* Glial Innate Immunity Generated by Non-Aggregated Alpha-Synuclein in Mouse: Differences between Wild-type and Parkinson's Disease-Linked Mutants. *PLoS ONE* 2010;**5**. doi:10.1371/journal.pone.0013481
- 444 Chien C-H, Lee M-J, Liou H-C, *et al.* Microglia-Derived Cytokines/Chemokines Are Involved in the Enhancement of LPS-Induced Loss of Nigrostriatal Dopaminergic Neurons in DJ-1 Knockout Mice. *PloS One* 2016;**11**:e0151569. doi:10.1371/journal.pone.0151569
- 445 Chao Y, Wong SC, Tan EK. Evidence of inflammatory system involvement in Parkinson's disease. *BioMed Res Int* 2014;**2014**:308654. doi:10.1155/2014/308654
- 446 Joe E-H, Choi D-J, An J, *et al.* Astrocytes, Microglia, and Parkinson's Disease. *Exp Neurobiol* 2018;**27**:77–87. doi:10.5607/en.2018.27.2.77
- 447 Booth HDE, Hirst WD, Wade-Martins R. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends Neurosci* 2017;**40**:358–70. doi:10.1016/j.tins.2017.04.001
- 448 Wick MM. 3,4-Dihydroxybenzylamine: a dopamine analog with enhanced antitumor activity against B16 melanoma. *J Natl Cancer Inst* 1979;**63**:1465–7.
- 449 Wick MM. Levodopa and dopamine analogs: melanin precursors as antitumor agents in experimental human and murine leukemia. *Cancer Treat Rep* 1979;**63**:991–7.
- 450 Wick MM. Levodopa and dopamine analogs as DNA polymerase inhibitors and antitumor agents in human melanoma. *Cancer Res* 1980;**40**:1414–8.
- 451 Basu S, Dasgupta PS. Role of dopamine in malignant tumor growth. *Endocrine* 2000;**12**:237–41. doi:10.1385/ENDO:12:3:237
- 452 Basu S, Dasgupta PS. Dopamine, a neurotransmitter, influences the immune system. *J Neuroimmunol* 2000;**102**:113–24. doi:10.1016/s0165-5728(99)00176-9
- 453 Ricci A, Collier WL, Amenta F. Pharmacological characterization and autoradiographic localization of dopamine receptors in the portal vein. *J Auton Pharmacol* 1994;**14**:61–8. doi:10.1111/j.1474-8673.1994.tb00590.x
- 454 Bacic F, Uematsu S, McCarron RM, *et al.* Dopaminergic receptors linked to adenylate cyclase in human cerebrovascular endothelium. *J Neurochem* 1991;**57**:1774–80. doi:10.1111/j.1471-4159.1991.tb06380.x

- 455 Basu S, Nagy JA, Pal S, *et al.* The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2001;**7**:569–74. doi:10.1038/87895
- 456 Sarkar C, Chakroborty D, Mitra RB, *et al.* Dopamine in vivo inhibits VEGF-induced phosphorylation of VEGFR-2, MAPK, and focal adhesion kinase in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;**287**:H1554–1560. doi:10.1152/ajpheart.00272.2004
- 457 Sarkar C, Chakroborty D, Chowdhury UR, *et al.* Dopamine increases the efficacy of anticancer drugs in breast and colon cancer preclinical models. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2008;**14**:2502–10. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1778
- 458 Wu MH. Endothelial focal adhesions and barrier function. *J Physiol* 2005;**569**:359–66. doi:10.1113/jphysiol.2005.096537
- 459 Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 2002;**12**:9–18. doi:10.1038/sj.cr.7290105
- 460 Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2005;**23**:1011–27. doi:10.1200/JCO.2005.06.081
- 461 Chamary VL, Robson T, Loizidou M, *et al.* Progressive loss of perivascular nerves adjacent to colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol* 2000;**26**:588–93. doi:10.1053/ejso.2000.0952
- 462 Basu S, Dasgupta PS. Decreased dopamine receptor expression and its second-messenger cAMP in malignant human colon tissue. *Dig Dis Sci* 1999;**44**:916–21. doi:10.1023/a:1026644110737
- 463 Ruocco I, Cuello AC, Parent A, *et al.* Skin blood vessels are simultaneously innervated by sensory, sympathetic, and parasympathetic fibers. *J Comp Neurol* 2002;**448**:323–36. doi:10.1002/cne.10241
- 464 Basu S, Sarkar C, Chakroborty D, *et al.* Ablation of peripheral dopaminergic nerves stimulates malignant tumor growth by inducing vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Cancer Res* 2004;**64**:5551–5. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1600
- 465 Chakroborty D, Sarkar C, Mitra RB, *et al.* Depleted dopamine in gastric cancer tissues: dopamine treatment retards growth of gastric cancer by inhibiting angiogenesis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2004;**10**:4349–56. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0059
- 466 Hoepfner LH, Wang Y, Sharma A, *et al.* Dopamine D2 receptor agonists inhibit lung cancer progression by reducing angiogenesis and tumor infiltrating myeloid derived suppressor cells. *Mol Oncol* 2015;**9**:270–81. doi:10.1016/j.molonc.2014.08.008
- 467 Sarkar C, Chakroborty D, Dasgupta PS, *et al.* Dopamine is a safe antiangiogenic drug which can also prevent 5-fluorouracil induced neutropenia. *Int J Cancer* 2015;**137**:744–9. doi:10.1002/ijc.29414
- 468 Eskandari F, Sternberg EM. Neural-immune interactions in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 2002;**966**:20–7. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb04198.x
- 469 Sarkar C, Basu B, Chakroborty D, *et al.* The immunoregulatory role of dopamine: an update. *Brain Behav Immun* 2010;**24**:525–8. doi:10.1016/j.bbi.2009.10.015
- 470 Arreola R, Alvarez-Herrera S, Pérez-Sánchez G, *et al.* Immunomodulatory Effects Mediated by Dopamine. *J Immunol Res* 2016;**2016**:3160486. doi:10.1155/2016/3160486
- 471 Kirillova GP, Hrutkay RJ, Shurin MR, *et al.* Dopamine receptors in human lymphocytes: radioligand binding and quantitative RT-PCR assays. *J Neurosci Methods* 2008;**174**:272–80. doi:10.1016/j.jneumeth.2008.07.018
- 472 McKenna F, McLaughlin PJ, Lewis BJ, *et al.* Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: a flow cytometric study. *J Neuroimmunol* 2002;**132**:34–40. doi:10.1016/s0165-5728(02)00280-1
- 473 Nakano K, Higashi T, Takagi R, *et al.* Dopamine released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation. *Int Immunol* 2009;**21**:645–54. doi:10.1093/intimm/dxp033

- 474 Cosentino M, Fietta AM, Ferrari M, *et al.* Human CD4+CD25+ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop. *Blood* 2007;**109**:632–42. doi:10.1182/blood-2006-01-028423
- 475 Levite M, Chowers Y, Ganor Y, *et al.* Dopamine interacts directly with its D3 and D2 receptors on normal human T cells, and activates beta1 integrin function. *Eur J Immunol* 2001;**31**:3504–12. doi:10.1002/1521-4141(200112)31:12<3504::aid-immu3504>3.0.co;2-f
- 476 Besser MJ, Ganor Y, Levite M. Dopamine by itself activates either D2, D3 or D1/D5 dopaminergic receptors in normal human T-cells and triggers the selective secretion of either IL-10, TNFalpha or both. *J Neuroimmunol* 2005;**169**:161–71. doi:10.1016/j.jneuroim.2005.07.013
- 477 Ghosh MC, Mondal AC, Basu S, *et al.* Dopamine inhibits cytokine release and expression of tyrosine kinases, Lck and Fyn in activated T cells. *Int Immunopharmacol* 2003;**3**:1019–26. doi:10.1016/S1567-5769(03)00100-0
- 478 Sarkar C, Das S, Chakroborty D, *et al.* Cutting Edge: Stimulation of Dopamine D4 Receptors Induce T Cell Quiescence by Up-Regulating Krüppel-Like Factor-2 Expression through Inhibition of ERK1/ERK2 Phosphorylation. *J Immunol* 2006;**177**:7525–9. doi:10.4049/jimmunol.177.11.7525
- 479 Ilani T, Strous RD, Fuchs S. Dopaminergic regulation of immune cells via D3 dopamine receptor: a pathway mediated by activated T cells. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2004;**18**:1600–2. doi:10.1096/fj.04-1652fje
- 480 Nagai Y, Ueno S, Saeki Y, *et al.* Decrease of the D3 dopamine receptor mRNA expression in lymphocytes from patients with Parkinson's disease. *Neurology* 1996;**46**:791–5. doi:10.1212/wnl.46.3.791
- 481 Chung S-D, Ho J-D, Hu C-C, *et al.* Increased risk of Parkinson disease following a diagnosis of neovascular age-related macular degeneration: a retrospective cohort study. *Am J Ophthalmol* 2014;**157**:464-469.e1. doi:10.1016/j.ajo.2013.09.026
- 482 Choi S, Jahng WJ, Park SM, *et al.* Association of Age-Related Macular Degeneration on Alzheimer or Parkinson Disease: A Retrospective Cohort Study. *Am J Ophthalmol* 2020;**210**:41–7. doi:10.1016/j.ajo.2019.11.001
- 483 Etminan M, Samii A, He B. Risk of Parkinson's disease in patients with neovascular age-related macular degeneration. *J Curr Ophthalmol* 2018;**30**:365–7. doi:10.1016/j.joco.2018.08.004
- 484 Thanvi B, Lo N, Robinson T. Vascular parkinsonism--an important cause of parkinsonism in older people. *Age Ageing* 2005;**34**:114–9. doi:10.1093/ageing/afi025
- 485 Winikates J, Jankovic J. Clinical correlates of vascular parkinsonism. *Arch Neurol* 1999;**56**:98–102. doi:10.1001/archneur.56.1.98
- 486 Hyman L, Schachat AP, He Q, *et al.* Hypertension, cardiovascular disease, and age-related macular degeneration. Age-Related Macular Degeneration Risk Factors Study Group. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960* 2000;**118**:351–8. doi:10.1001/archophth.118.3.351
- 487 Delcourt C, Michel F, Colvez A, *et al.* Associations of cardiovascular disease and its risk factors with age-related macular degeneration: the POLA study. *Ophthalmic Epidemiol* 2001;**8**:237–49. doi:10.1076/opep.8.4.237.1613
- 488 McKay GJ, Patterson CC, Chakravarthy U, *et al.* Evidence of association of APOE with age-related macular degeneration: a pooled analysis of 15 studies. *Hum Mutat* 2011;**32**:1407–16. doi:10.1002/humu.21577
- 489 Huang X, Chen PC, Poole C. APOE-[epsilon]2 allele associated with higher prevalence of sporadic Parkinson disease. *Neurology* 2004;**62**:2198–202. doi:10.1212/01.wnl.0000130159.28215.6a
- 490 Ritz B, Ascherio A, Checkoway H, *et al.* Pooled Analysis of Tobacco Use and Risk of Parkinson Disease. *Arch Neurol* 2007;**64**:990–7. doi:10.1001/archneur.64.7.990
- 491 Ritz B, Lee P-C, Lassen CF, *et al.* Parkinson disease and smoking revisited: ease of quitting is an early sign of the disease. *Neurology* 2014;**83**:1396–402. doi:10.1212/WNL.0000000000000879

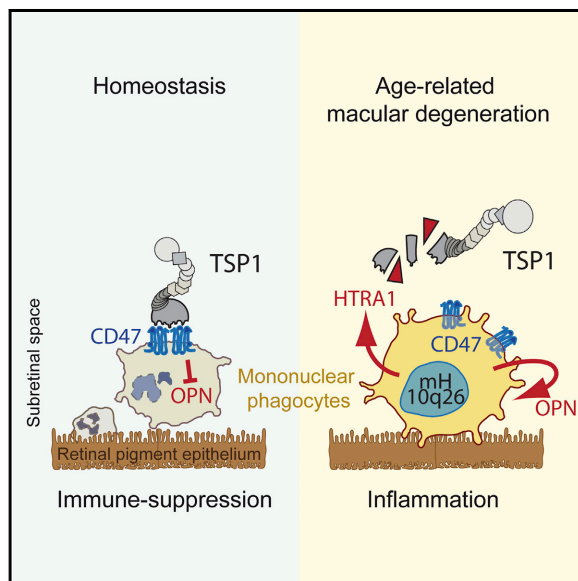
- 492 Brilliant MH, Vaziri K, Connor TB, *et al.* Mining Retrospective Data for Virtual Prospective Drug Repurposing: L-DOPA and Age-related Macular Degeneration. *Am J Med* 2016;**129**:292–8. doi:10.1016/j.amjmed.2015.10.015
- 493 Lopez VM, Decatur CL, Stamer WD, *et al.* L-DOPA is an endogenous ligand for OA1. *PLoS Biol* 2008;**6**:e236. doi:10.1371/journal.pbio.0060236
- 494 Falk T, Congrove NR, Zhang S, *et al.* PEDF and VEGF-A Output from Human Retinal Pigment Epithelial Cells Grown on Novel Microcarriers. *J Biomed Biotechnol* 2012;**2012**. doi:10.1155/2012/278932
- 495 McKay BS. Pigmentation and Vision: Is GPR143 in Control? *J Neurosci Res* 2019;**97**:77–87. doi:10.1002/jnr.24246
- 496 Figueroa AG, McKay BS. A G-Protein Coupled Receptor and Macular Degeneration. *Cells* 2020;**9**. doi:10.3390/cells9040910
- 497 Ceballos-Baumann AO, von Kummer R, Eckert W, *et al.* Controlled-release levodopa/benserazide (Madopar HBS): clinical observations and levodopa and dopamine plasma concentrations in fluctuating parkinsonian patients. *J Neurol* 1990;**237**:24–8.
- 498 Rough K, Thompson JT. When Does Size Matter? Promises, Pitfalls, and Appropriate Interpretation of “Big” Medical Records Data. *Ophthalmology* 2018;**125**:1136–8. doi:10.1016/j.ophtha.2018.04.034
- 499 Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson’s disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 2009;**8**:382–97. doi:10.1016/S1474-4422(09)70062-6
- 500 Parillaud VR, Lornet G, Monnet Y, *et al.* Analysis of monocyte infiltration in MPTP mice reveals that microglial CX3CR1 protects against neurotoxic over-induction of monocyte-attracting CCL2 by astrocytes. *J Neuroinflammation* 2017;**14**:60. doi:10.1186/s12974-017-0830-9
- 501 Streilein JW, Ma N, Wenkel H, *et al.* Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Res* 2002;**42**:487–95.
- 502 Espinosa-Heidmann DG, Suner IJ, Hernandez EP, *et al.* Macrophage depletion diminishes lesion size and severity in experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;**44**:3586–92.
- 503 Nakazawa T, Hisatomi T, Nakazawa C, *et al.* Monocyte chemoattractant protein 1 mediates retinal detachment-induced photoreceptor apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:2425–30. doi:10.1073/pnas.0608167104
- 504 Yi X, Ogata N, Komada M, *et al.* Vascular endothelial growth factor expression in choroidal neovascularization in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Für Klin Exp Ophthalmol* 1997;**235**:313–9.
- 505 Ishibashi T, Hata Y, Yoshikawa H, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Für Klin Exp Ophthalmol* 1997;**235**:159–67.
- 506 Oh H, Takagi H, Takagi C, *et al.* The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;**40**:1891–8.
- 507 Rossol M, Heine H, Meusch U, *et al.* LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol* 2011;**31**:379–446.
- 508 Hanisch U-K. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 2002;**40**:140–55. doi:10.1002/glia.10161
- 509 Schildberger A, Rossmanith E, Eichhorn T, *et al.* Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm* 2013;**2013**:697972. doi:10.1155/2013/697972
- 510 Housset M, Samuel A, Ettaiche M, *et al.* Loss of Otx2 in the adult retina disrupts retinal pigment epithelium function, causing photoreceptor degeneration. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2013;**33**:9890–904. doi:10.1523/JNEUROSCI.1099-13.2013

- 511 Makiyama Y, Ooto S, Hangai M, *et al.* Cone abnormalities in fundus albipunctatus associated with RDH5 mutations assessed using adaptive optics scanning laser ophthalmoscopy. *Am J Ophthalmol* 2014;**157**:558-570.e1-4. doi:10.1016/j.ajo.2013.10.021
- 512 Wright AF, Chakarova CF, Abd El-Aziz MM, *et al.* Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat Rev Genet* 2010;**11**:273–84. doi:10.1038/nrg2717
- 513 Andreaskos E, Sacre SM, Smith C, *et al.* Distinct pathways of LPS-induced NF-kappa B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP. *Blood* 2004;**103**:2229–37. doi:10.1182/blood-2003-04-1356
- 514 Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;**1**:a001651. doi:10.1101/cshperspect.a001651
- 515 Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol* 2015;**15**:362–74. doi:10.1038/nri3834
- 516 Przedborski S, Jackson-Lewis V, Naini AB, *et al.* The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J Neurochem* 2001;**76**:1265–74. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00183.x
- 517 Derouiche A, Asan E. The dopamine D2 receptor subfamily in rat retina: ultrastructural immunogold and in situ hybridization studies. *Eur J Neurosci* 1999;**11**:1391–402.
- 518 Jackson CR, Chaurasia SS, Zhou H, *et al.* Essential roles of dopamine D4 receptors and the type 1 adenylyl cyclase in photic control of cyclic AMP in photoreceptor cells. *J Neurochem* 2009;**109**:148–57. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05920.x
- 519 Nguyen-Legros J, Versaux-Botteri C, Vernier P. Dopamine receptor localization in the mammalian retina. *Mol Neurobiol* 1999;**19**:181–204. doi:10.1007/BF02821713
- 520 Lundblad M, Usiello A, Carta M, *et al.* Pharmacological validation of a mouse model of l-DOPA-induced dyskinesia. *Exp Neurol* 2005;**194**:66–75. doi:10.1016/j.expneurol.2005.02.002
- 521 Rose S, Jenner P, Marsden CD. The effect of carbidopa on plasma and muscle levels of L-dopa, dopamine, and their metabolites following L-dopa administration to rats. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 1988;**3**:117–25. doi:10.1002/mds.870030203
- 522 Ming M, Li X, Fan X, *et al.* Retinal pigment epithelial cells secrete neurotrophic factors and synthesize dopamine: possible contribution to therapeutic effects of RPE cell transplantation in Parkinson's disease. *J Transl Med* 2009;**7**:53. doi:10.1186/1479-5876-7-53
- 523 Misu Y, Goshima Y, Ueda H, *et al.* Neurobiology of L-DOPAergic systems. *Prog Neurobiol* 1996;**49**:415–54. doi:10.1016/0301-0082(96)00025-1
- 524 Shome S, Rana T, Ganguly S, *et al.* Dopamine regulates angiogenesis in normal dermal wound tissues. *PloS One* 2011;**6**:e25215. doi:10.1371/journal.pone.0025215
- 525 Sinha S, Vohra PK, Bhattacharya R, *et al.* Dopamine regulates phosphorylation of VEGF receptor 2 by engaging Src-homology-2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2. *J Cell Sci* 2009;**122**:3385–92. doi:10.1242/jcs.053124

Immunity

The 10q26 Risk Haplotype of Age-Related Macular Degeneration Aggravates Subretinal Inflammation by Impairing Monocyte Elimination

Graphical Abstract



Authors

Fanny Beguier, Michael Housset, Christophe Roubey, ..., Cécile Delarasse, Xavier Guillonnet, Florian Sennlaub

Correspondence

florian.sennlaub@inserm.fr

In Brief

A minor haplotype of the 10q26 locus conveys the strongest genetic risk for age-related macular degeneration (AMD). Beguier et al. provide a mechanistic understanding of this susceptibility by linking this risk haplotype to overexpression of the peptidase HTRA1 and thereby to the accumulation of macrophages in the subretinal space and pathogenic inflammation.

Highlights

- 10q26 AMD-risk haplotype carrying monocytes overexpress HTRA1 and OPN
- HTRA1 locates to mononuclear phagocytes in eyes of patients with AMD
- HTRA1 proteolysis of TSP-1 curbs CD47-dependent OPN repression
- HTRA1 induced OPN promotes pathogenic subretinal MP accumulation



Beguier et al., 2020, Immunity 53, 429–441
August 18, 2020 © 2020 Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.021>



Article

The 10q26 Risk Haplotype of Age-Related Macular Degeneration Aggravates Subretinal Inflammation by Impairing Monocyte Elimination

Fanny Beguier,^{1,8} Michael Housset,^{1,8} Christophe Roubeyx,^{1,8} Sebastien Augustin,¹ Yvrick Zagar,¹ Caroline Nous,¹ Thibaud Mathis,¹ Chiara Eandi,³ Mustapha Benchaboune,⁵ Adèle Drame-Maigné,¹ Wassila Carpentier,¹ Solenne Chardonnet,² Sara Touhami,¹ Guillaume Blot,¹ Jean Baptiste Conart,¹ Hugo Charles-Messance,¹ Anaïs Potey,¹ Jean-François Girmens,⁵ Michel Paques,⁵ Frédéric Blond,¹ Thierry Leveillard,¹ Elod Koertvely,⁶ Jerome E. Roger,⁴ José-Alain Sahel,^{1,5} Przemyslaw Sapieha,⁷ Cécile Delarasse,¹ Xavier Guillonnet,¹ and Florian Sennlaub^{1,9,*}

¹Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, 17 rue Moreau, F-75012 Paris, France

²Sorbonne Université, INSERM, UMS 37 PASS, Plateforme Post-génomique de la Pitié-Salpêtrière, P3S, F-75013 Paris, France

³University of Torino, Department of Surgical Science, Torino, Italy

⁴Paris-Saclay Institute of Neuroscience, CERTO-Retina France, CNRS, Univ Paris Sud, Université Paris-Saclay, F-91405 Orsay

⁵CHNO des Quinze-Vingts, DHU Sight Restore, INSERM-DGOS CIC 1423, 28 rue de Charenton, F-75012 Paris, France

⁶Roche Pharma Research and Early Development, Roche Innovation Center Basel, 124 Grenzacherstrasse, 4070, Basel, Switzerland

⁷Department of Ophthalmology, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Quebec, Canada

⁸These authors contributed equally

⁹Lead Contact

*Correspondence: florian.sennlaub@inserm.fr

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.021>

SUMMARY

A minor haplotype of the 10q26 locus conveys the strongest genetic risk for age-related macular degeneration (AMD). Here, we examined the mechanisms underlying this susceptibility. We found that monocytes from homozygous carriers of the 10q26 AMD-risk haplotype expressed high amounts of the serine peptidase HTRA1, and HTRA1 located to mononuclear phagocytes (MPs) in eyes of non-carriers with AMD. HTRA1 induced the persistence of monocytes in the subretinal space and exacerbated pathogenic inflammation by hydrolyzing thrombospondin 1 (TSP1), which separated the two CD47-binding sites within TSP1 that are necessary for efficient CD47 activation. This HTRA1-induced inhibition of CD47 signaling induced the expression of pro-inflammatory osteopontin (OPN). OPN expression increased in early monocyte-derived macrophages in 10q26 risk carriers. In models of subretinal inflammation and AMD, OPN deletion or pharmacological inhibition reversed HTRA1-induced pathogenic MP persistence. Our findings argue for the therapeutic potential of CD47 agonists and OPN inhibitors for the treatment of AMD.

INTRODUCTION

Age-related macular degeneration (AMD) is a common (Wong et al., 2014), highly heritable, neuroinflammatory disorder characterized by subretinal deposits (drusen) in its early form and choroidal neovascularisation (wet AMD) or an extending lesion of the outer central retina (geographic atrophy) in its late form (Sarks, 1976). A variant of the complement factor H (CFH) and a minor haplotype (mH) of the chromosome 10q26 account for most of the genetic risk of AMD (Fritsche et al., 2014). The AMD-associated mH differs from the common non-risk haplotype (cH) by several linked single nucleotide polymorphisms (SNPs) in a non-coding DNA sequence (Liao et al., 2017) and increases the risk for both early and late forms of AMD up to ~10-fold in homozygote mH (mH/mH) carriers (Chen et al., 2009; Rivera et al., 2005). These non-coding SNPs are located within the *age-related maculopathy susceptibility 2* (ARMS2) gene

and the promoter of *high-temperature requirement A serine peptidase 1* (HTRA1) and are in close proximity of *pleckstrin homology domain-containing family A member 1* (PLEKHA1).

Small studies of three to six mH/mH carriers proposed that the mH is associated with increased transcription of the adjacent HTRA1 gene in lymphocytes and the retinal pigment epithelium (RPE) (An et al., 2010; Yang et al., 2006), which was not confirmed by others (Chowers et al., 2008; Kanda et al., 2010). Independently of the haplotype, HTRA1 concentrations are increased in the aqueous humor of wet AMD patients (Tosi et al., 2017), HTRA1 deposits in drusen (Yang et al., 2006), and overexpression of HTRA1 in mice and fish induces an AMD-like phenotype (Iejima et al., 2015; Jones et al., 2011; Oura et al., 2018), suggesting a role of HTRA1 in AMD pathogenesis. HTRA1 is also elevated in the plasma of subjects with age-related frailty (Lorenzi et al., 2016), Alzheimer's disease (Grau et al., 2005), and arthritis, where it is strongly expressed by



activated, infiltrating macrophages (Hou et al., 2014; Milner et al., 2008). HTRA1 is a protease of the trypsin family of serine proteases that hydrolyzes many extracellular matrix (ECM) proteins, including thrombospondin 1 (TSP1) (Chen et al., 2018; Lin et al., 2018), and inactivates transforming growth factor β (TGF- β) (Clausen et al., 2011). The importance and functional consequences of the hydrolysis of these proteins in AMD are unknown.

Under physiological conditions, the subretinal space is immunosuppressive and devoid of mononuclear phagocytes (MPs) (Guillonneau et al., 2017), a family of cells that include monocytes, and infiltrating and resident macrophages. A common feature of early and both advanced forms of AMD is the activation of MPs in the inner retina and the chronic accumulation of subretinal MPs. Contrary to inherited retinal degeneration, the infiltrate is not only composed of displaced microglial cells (the resident M ϕ of the retina) (O'Koren et al., 2019), but also of macrophages derived from infiltrating monocytes (Guillonneau et al., 2017; Sennlaub et al., 2013). MPs play a critical role in neovascularization and photoreceptor degeneration that characterize late AMD (Guillonneau et al., 2017).

The homeostatic elimination of infiltrating MPs is dependent on TSP1-mediated activation of the CD47 receptor and is inhibited by CFH, in particular the AMD-associated CFH(H402) variant (Calippe et al., 2017). Each monomer of the homotrimeric TSP1 contains two valine-valine-methionine (VVM) sequences in its C-terminal domain that each interacts with a CD47 receptor. The efficient activation of CD47 by TSP1 necessitates the presence of both VVM sites of TSP1 (McDonald et al., 2003) but can be mimicked by the TSP1-derived 4N1K peptide (KRFYVVMWKK) (Martinez-Torres et al., 2015) at 50-fold higher molar concentrations (McDonald et al., 2003).

Here, we examined the mechanisms whereby the risk 10q26 haplotype promotes AMD. We found that monocytes carrying this haplotype overexpress HTRA1. Overexpression of HTRA1, through the proteolysis of TSP1 and inhibition of CD47 signaling, induced osteopontin (OPN) (also known as secreted phosphoprotein 1 [SPP1]), which in turn inhibited the homeostatic elimination of macrophages from the subretinal space and mediated HTRA1-induced pathogenic inflammation. Our study provides insight into the cellular mechanisms underlying the 10q26 AMD-risk haplotype of AMD and argues for the use of CD47 agonists and OPN inhibitors for the treatment of AMD.

RESULTS

Monocytes of Homozygous Carriers of the 10q26 Risk Haplotype Express Increased HTRA1 and HTRA1 Localizes to Mononuclear Phagocytes in AMD Donor Tissues

The AMD-risk mH of 10q26 is defined by a set of neighboring non-coding SNPs located within the *ARMS2* gene and *HTRA1* promoter, in close proximity of *PLEKHA1*. The mH has been proposed to be associated with increased expression of *HTRA1* in lymphocytes and decreased *ARMS2* in monocytes (Micklisch et al., 2017; Yang et al., 2006).

Our analysis of DNase I hypersensitive sites by using the Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) database revealed that open chromatin regions of the *HTRA1* promoter were most

prominent in CD14⁺ monocytes compared with in CD4⁺T and RPE cells. An open region of *ARMS2* was observed in RPE but not in CD4⁺ T cells and CD14⁺Mos, and open chromatin regions in the *PLEKHA1* promoter were similar in the three cell types (Figure 1A). Accordingly, *HTRA1* mRNA, detected by RT-PCR, was several hundred folds more transcribed in blood CD14⁺ monocytes than in lymphocytes (Figure 1B) used in previous studies (Yang et al., 2006).

Taking advantage of our previous genome-wide association study (GWAS) (Fritsche et al., 2013) that included 10 SNP markers of the 10q26 haplotype, we re-invited 18 homozygous cH/cH and 18 mH/mH carriers and constituted a collection of mRNA extracted from their sorted CD14⁺ blood monocytes. None of the patients displayed one of the rare, incomplete haplotypes. The two study groups were similar in age (~80 years) and gender distribution, were composed of 50% subjects with late AMD and 50% subjects with no signs of AMD (to match a possible disease effect), and were equal in the CFH402H variant frequency (Figure S1A). *PLEKHA1* mRNA levels in mH/mH monocytes were slightly lower than those of cH/cH donors (Figure 1C). *ARMS2* mRNA was not detected in either group by using commercially validated and published primers (Micklisch et al., 2017) (> 50 PCR cycles) (Figure 1D). But, mH/mH monocytes showed 2-fold higher levels of *HTRA1* mRNA (Figure 1E) and secreted more HTRA1 into 24 h supernatants (Figure 1F) than did cH/cH monocytes.

Next, we analyzed the localization of HTRA1 in HTRA1-IBA1 double-immuno-labeled retinal flat-mounts and HTRA1 mono-labeled corresponding RPE flat-mounts (no double labeling because of autofluorescence) in four patients with known wet AMD and visible large drusen on dissection and four age-matched control donor eyes (all donors cH/cH). Representative confocal images of the central inner retina show diffuse, low-level staining of HTRA1 (green) of the healthy retina and distinctly HTRA1⁺IBA1⁺ (red) monocytes in the inner retinal vessels (Figures 1G and S1E), confirming the mRNA expression in leukocytes above. The central inner retina of wet AMD tissues additionally displayed many IBA1⁺HTRA1⁺ MPs (Figures 1H and S1E). Subretinally, the HTRA1 staining appeared increased in RPE with numerous subretinal HTRA1⁺ cells on the apical side of the autofluorescent RPE (orange) in AMD (Figure 1H), but not in control samples (Figures 1G and S1F). Micrographs of the subretinal aspect of the double-labeled retinal flat-mounts demonstrate that HTRA1 again localized to IBA1⁺ MPs (Figure 1H, insets). Altogether, these data show that MPs in AMD, which are in part derived from monocytes (Sennlaub et al., 2013), express HTRA1 and that the AMD-risk haplotype increases the expression of HTRA1 at least in monocytes.

HTRA1 Hydrolyzes Thrombospondin-1 and Separates Its Two CD47-Binding Sites

We recently demonstrated that TSP1 as a ligand of CD47 is a crucial mediator for the homeostatic elimination of pathogenic subretinal MPs (Calippe et al., 2017). Gel electrophoretic separation and silver nitrate protein staining of co-incubated recombinant TSP1 and HTRA1 proteins, confirmed previous reports (Chen et al., 2018; Lin et al., 2018) that TSP1 is a substrate for HTRA1. The 170 kDa TSP1 monomer full-length band disappeared HTRA1 dose dependently (Figure 2A). Two major bands

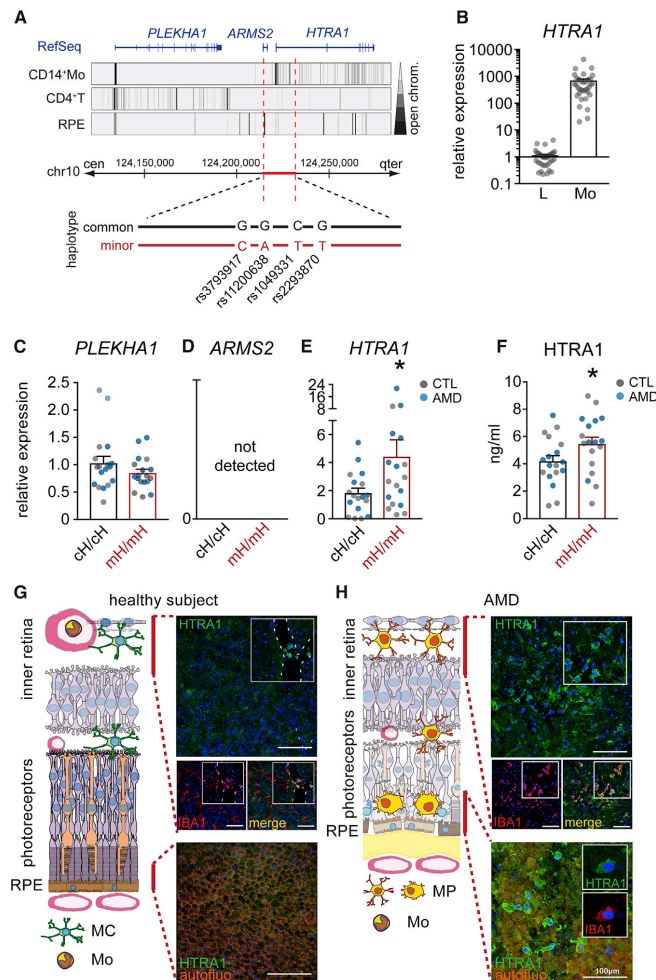


Figure 1. Monocytes of Homozygous Carriers of the 10q26 Risk-Haplotype Express Increased Levels of HTRA1, and HTRA1 Is Strongly Expressed in Retinal Mononuclear Phagocytes in AMD

(A) Diagram of the topography of the chromosome 10q26 region indicating (1) the intron-exon structures of *PLEKHA1*, *ARMS2*, and *HTRA1* genes (blue); (2) the corresponding open chromatin sites, representing the highest DNase I hypersensitive sites by the darkest stripes, of CD14⁺ monocytes, CD4⁺ T cells, and RPE extracted from the ENCODE database; and (3) the location of the AMD-risk-defining SNPs (indicated by the thick red line). Additionally, an expanded non-linear representation of the four haplotype markers used to identify the cH and the mH AMD-risk haplotype is shown.

(B–E) Quantitative RT-PCR of the *HTRA1* (B and E), *PLEKHA1* (C), *ARMS2* (D) mRNA normalized with the average of *ACTB*, *G6PDH*, *GAPDH*, *HPRT1*, *RPS26*, and *RPL37A* mRNA of fresh, sorted blood lymphocytes (B) and CD14⁺ monocytes (B–E) of all 36 study participants (B) and cH/cH and mH/mH donors (C–E) (n = 18 per group). Student's t test, *p = 0.0233; Mann-Whitney U test, *p = 0.0337.

(F) *HTRA1* protein concentrations of supernatants (ELISA) of 24 h monocyte cultures from cH/cH and mH/mH donors (n = 18 per group). Student's t test, *p = 0.0348; Mann-Whitney U test, *p = 0.0416.

(G and H) Representative confocal images of central flatmounts of HTRA1 and IBA1-double-immuno-labeled retina and HTRA1-single-immuno-labeled RPE flatmount from control (G) and AMD cH/cH donor eyes (H). The location of the image planes is indicated in the cartoons. HTRA1 is shown in green and IBA1 is shown in red. Data are represented as mean ± SEM. Abbreviations are as follows: CD4-expressing T lymphocytes, CD4⁺T; CD14⁺ monocyte, Mo; retinal pigment epithelium, RPE; lymphocyte, L; chromosome 10, chr10; homozygous common haplotype carriers, cH/cH; homozygous minor AMD-risk haplotype carriers, mH/mH; microglial cell, MC; mononuclear phagocyte, MP. Scale bar, 100 μm.

above 100 kDa were detectable with the lower HTRA1 concentration, and four weaker bands only appeared with higher HTRA1 concentration (2 bands in the 90 kDa range and 2 bands in the 30 kDa range).

To identify potential HTRA1 cleavage sites in TSP1, samples of TSP1 and TSP1 hydrolyzed with the highest HTRA1 concentration were submitted to tryptic digestion prior to liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Cleavage sites of HTRA1 have never been reported distal to arginine and lysine (Eigenbrot et al., 2012) amino acids, the two exclusive cleavage sites of trypsin, making it unlikely that HTRA1 hydrolysis occurs at tryptic sites. We reproducibly identified eight peptides with non-tryptic cleavage at one of its ends (semi-tryptic

peptide) with high identification scores in both complementary search engines, PEAKS and Mascot (Figures 2B and S2A). These peptides were found in tryptic-digestion of HTRA1-hydrolyzed TSP1 fragments only but were absent from TSP1 preparations without HTRA1. Three HTRA1 cleavage sites were located in the N-terminal domain, one in TSP1's vWFC domain and four in its C-terminal domain (Figures 2C and S2B). Western blotting of HTRA1-induced TSP1 fragments with an antibody raised against the first 14 N-terminal TSP1 amino acids (Figure 2D) demonstrates that the two major fragments (> 100 kDa), and two minor cleavage products, still contained their N-terminal extremity, revealing an HTRA1 hydrolysis at their C-terminal domain.

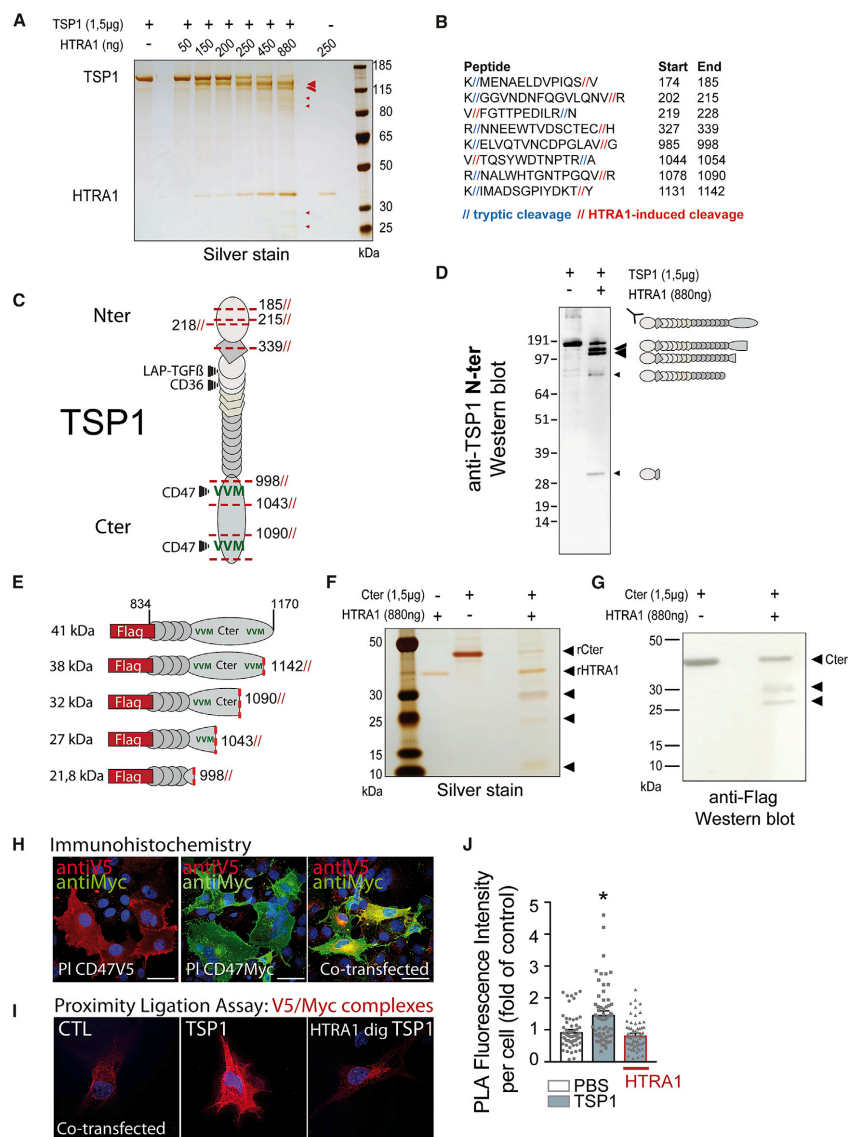


Figure 2. HTRA1 Hydrolyzes Thrombospondin-1 and Separates Its Two CD47-Binding Sites

(A) Silver-nitrate-stained polyacrylamide gel after electrophoretic migration of recombinant TSP1, recombinant HTRA1, or 12-h-HTRA1-incubated TSP1 of indicated quantities. TSP1 fragments indicated with arrowheads.

(B) Peptide sequences with non-tryptic cleavage sites (red double slash) identified consistently and exclusively in HTRA1-digested TSP1 condition in three different analyses of two digestion preparations by LC-MS/MS and identified in two complementary search engines (PEAKS and Mascot).

(C) Schematic representation of the native TSP1 protein: Nter; Von Willebrand factor domain (square); Type 1, 2, and 3 domains; Cter; VVMs; and regions of interaction with indicated ligands. Positions of potential HTRA1-induced cleavage sites identified by mass spectrometry are indicated (dashed lines).

(legend continued on next page)

To determine which two of the four C-terminal cleavage sites identified by mass spectrometry led to the two major TSP1 fragments, we generated a recombinant protein of TSP1's C terminus (rCter) from amino acids 834 to 1170, bearing a FLAG-epitope at its N terminus (Figure S2C). The expected sizes of HTRA1-digested flagged rCter fragments (cut distal to amino acid [AA] positions 1142, 1090, 1043, and 998) were 38 kDa, 32 kDa, 27 kDa, and 21.8 kDa, respectively (Figure 2E). Electrophoretic migration followed by silver nitrate stain of proteins showed that HTRA1 hydrolyzes Cter into a ~30 kDa, a ~25 kDa, and a ~10 kDa band (Figure 2F), suggesting positions 1043 and 1090 as cleavage sites; the un-tagged C terminus fragment explains the ~10 kDa band. A western blot using an anti-FLAG antibody accurately identified a 32 kDa and a 27 kDa fragment containing the N-terminal FLAG (Figure 2G) confirming HTRA1 predominantly cleaves TSP1 after V1043 and V1090, in accordance with HTRA1's preferential hydrolysis after valine amino acids (Chamberland et al., 2009; Eigenbrot et al., 2012). These results demonstrated that HTRA1 preferentially cleaves TSP1 between its two VVM motifs, which should severely hamper TSP1's ability to dimerize CD47 receptors.

We next mono- or co-transfected COS-7 cells with plasmids coding for a V5-tagged and Myc-tagged human CD47 receptors that are detectable with highly specific anti-tag-antibodies by immunohistochemistry (Figure 2H). The incubation of co-transfected cells with TSP1 greatly increased CD47-V5/CD47-Myc complex formation visualized by proximity ligation assay (PLA) (red dots). HTRA1 cleavage of TSP1 reduced its ability to form these complexes (Figures 2I, representative picture and 2J, quantification), in accordance with a separation of the two CD47-binding VVM motifs.

In summary, HTRA1 predominantly hydrolyzes TSP1 monomers at two cleavage sites, which separate its two CD47-binding VVM motifs of its C-terminal domain and reduces its ability to form CD47 complexes.

HTRA1-Induced Thrombospondin-1 Hydrolysis Prevents CD47-Dependent Monocyte Elimination

TSP1 activation of CD47 expressed on subretinal MPs triggers their RPE-induced elimination (Calippe et al., 2017), likely acting as a sensitizing factor to cell death induction by RPE factors such as Fas and Fas ligand (FASL) (Levy et al., 2015; Manna et al., 2005; Quesada et al., 2005).

Quantification of co-cultures of confluent porcine primary RPE with human blood monocytes that mimic subretinal monocyte

elimination (Mathis et al., 2017), immune-stained for myeloid transcription factor PU.1 and RPE transcription factor orthodenticle homeobox 2 (OTX2), revealed that the addition of HTRA1 (5 μ g/mL) reduced RPE-induced PU.1⁺ monocyte elimination (Figures 3A and 3B). HTRA1 exposure had no effect on OTX2⁺ RPE cell numbers or on PU.1⁺ monocyte numbers in monoculture (Figure 3B). Like HTRA1 exposure, exposure to function-blocking antibodies of TSP1 or CD47, but not CD36 (a TSP1 receptor necessary for TGF- β activation [Yehualaeshet et al., 1999]), inhibited monocyte elimination in 48 h co-cultures (Figure 3C). Inhibition of TGF- β receptor signaling, shown to mediate effects of HTRA1 (Clausen et al., 2011), had no influence on monocyte elimination in this model (Figure S3A). Addition of HTRA1 to the function-blocking TSP1 antibody only marginally further increased monocyte survival (Figure 3C). When we pre-incubated the RPE or the monocytes with HTRA1 for 2 h prior to co-culture, only the pre-incubation of the monocytes led to increased survival (Figure 3D). In addition, co-cultures of carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-pre-stained monocytes from wild-type and knockout mice with primary RPE demonstrated that deficiency in either TSP1 or CD47 (but not CD36) in monocytes was sufficient to increase monocyte survival similarly to HTRA1-exposed wild-type monocytes (Figure 3E). As with TSP1-blocking antibodies, the addition of HTRA1 to *Thbs1*^{-/-} monocytes only increased monocytes by 25% compared with the 150% increase of wild-type Mos. These results suggested that TSP1 is important in HTRA1s promotion of monocyte survival.

To evaluate whether the effect of HTRA1 was due to TSP1 degradation, we pre-incubated monocytes with HTRA1 for 30 min, removed HTRA1 and incubated the cells with either TSP1 or the rCter protein for 1 h, prior to co-culturing for 48 h. The HTRA1 pre-incubation-induced increase in monocyte survival could be completely reversed by 200 nM TSP1 and significantly reduced by 200 nM Cter (Figure 3F). CD47 activation by TSP1 can be mimicked by the KRFYVVMWKK (Martinez-Torres et al., 2015) that is derived from the first VVM site of TSP1 and does not contain a HTRA1 cleavage site (Figure S2B). Compared with the control peptide, 4N1K antagonized the HTRA1-induced increase in monocyte survival in co-cultures partially at 20 μ M and completely at 50 μ M (Figure 3G). The inhibition occurred, however, at much higher molar concentrations than with TSP1 and the Cter (200 nM) that both contain two VVM sites in tandem. Therefore, we linked two 4N1K peptides with an eight-glycine

(D) Western blot of 12-h-incubated TSP1 alone or with HTRA1 by using an antibody raised against TSP1 N-terminal 14 first amino acids. The four lower-weight bands identified after incubation with HTRA1 are indicated (arrowhead) with the corresponding predicted schematic representation of TSP1 N-terminal cleavage product (right cartoons).

(E) Schematic representation of the recombinant TSP1 C-terminal domain with a FLAG epitope at its N terminus (Cter) and its theoretical N-terminal cleavage products after HTRA1 digestion.

(F) Silver-nitrate-stained polyacrylamide gel after electrophoretic migration of Cter, HTRA1, or their mixture after 12 h incubation (37°C) in 50 μ L of a buffer optimized for HTRA1 activity at the indicated quantities. HTRA1 hydrolyzes Cter into fragments detectable at lower-weight bands (arrowheads).

(G) Western blot of 12 h incubated Cter alone or with HTRA1 at the indicated quantities by using an anti-FLAG antibody. Flagged N-terminal cleavage products of Cter by HTRA1 hydrolysis are visible at lower-weight bands (arrowheads).

(H–J) V5 and Myc immunohistochemistry (H) and proximity ligation assay (I) counterstained with Hoechst nuclear stain of mono- or co-transfected COS-7 cells with plasmids coding for a V5-tagged and Myc-tagged human CD47 receptor. V5-Myc complexes were revealed by proximity ligation assay (PLA) (red dots) of co-transfected cells, cells incubated with TSP1, or HTRA1-digested TSP1 for 10 min prior to fixation. The PLA fluorescence intensity was quantified (J); the experiment was repeated twice with similar results. One-way ANOVA/Bonferroni test: CTL versus TSP1, $p = 0.0002$; TSP1 versus HTRA1 digTSP1, $p < 0.0001$. Data are represented as mean $\pm$ SEM. Abbreviations are as follows: N-terminal domain, Nter; C-terminal domain, Cter; latency-associated peptide transforming growth factor beta, LAP-TGF β ; thrombospondin 1, TSP1; high-temperature requirement A serine peptidase 1, HTRA1; amino acid, AA. Scale bar, 50 μ m.

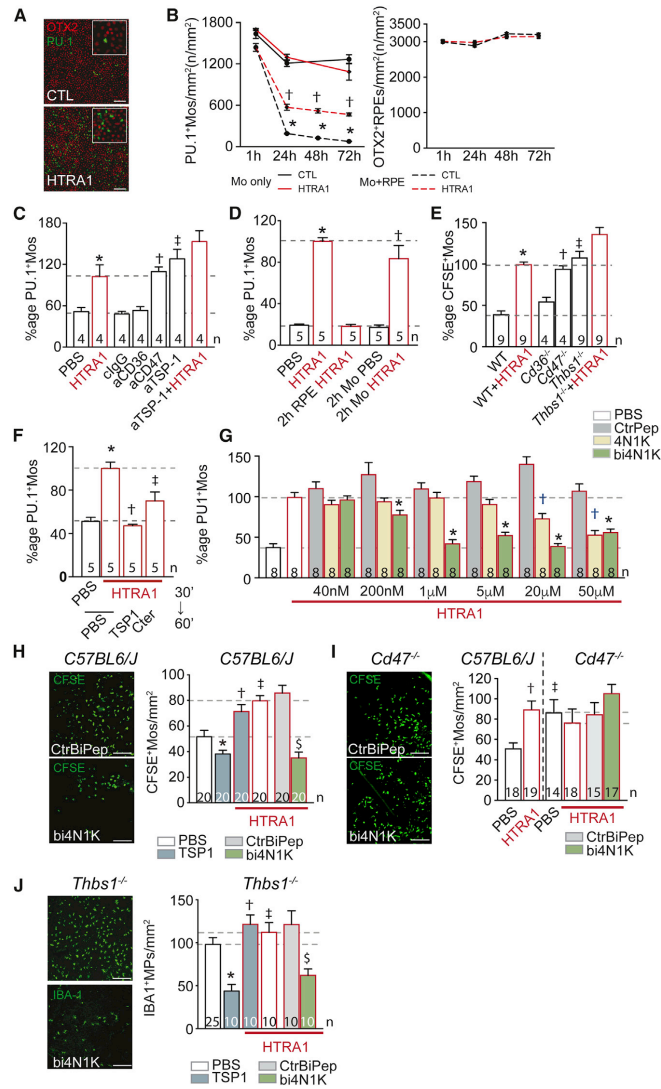


Figure 3. HTRA1-Induced Thrombospondin-1 Hydrolysis Prevents CD47-Dependent Monocyte Elimination

(A–I) Black lines and black-bordered columns represent conditions without exogenous HTRA1 and red lines and red-bordered columns represent conditions with exogenous HTRA1 (*in vitro*: 5 µg/mL; *in vivo*: injection solution containing 100 µg/mL). Dotted horizontal lines indicate the level of the PBS and HTRA1 conditions.

(A) Representative pictures (overview and magnification) of PU.1 (myeloid nuclear marker, green) and OTX2 (RPE nuclear marker, red) double-labeled co-cultures of primary porcine RPE and human cH/cH-CD14⁺ blood monocytes (48 h), incubated without (top) or with HTRA1 (bottom). (B) Corresponding quantification of PU.1⁺ monocyte-density in monoculture (left, continuous lines) or co-cultures of RPE and human monocytes (left, dotted lines), and OTX2⁺ RPE cell density in co-culture (right) after the indicated times (n = 6 per group). One-way ANOVA/Bonferroni test: RPE+monocytes versus monocytes, *p < 0.0001; RPE+monocytes+HTRA1 versus RPE+monocytes, †p < 0.0001.

(C) Monocyte counts in 48 h RPE/human cH/cH CD14⁺ monocyte co-cultures with control- or function-blocking antibodies as indicated (10 µg/mL), normalized for the number of monocytes in the HTRA1 condition. Mann-Whitney U test: monocytes versus monocytes+HTRA1, *p = 0.004; clgG versus aCD47, †p = 0.0286; clgG versus aTSP1, ‡p = 0.0286; clgG versus aCD36 and aTSP1 versus aTSP1+HTRA1, not significantly different.

(D) Monocyte counts in RPE/human cH/cH CD14⁺ monocyte co-cultures with PBS or HTRA1 (normalized for the number of monocytes in the HTRA1 condition). RPE or monocytes were pre-incubated for 2 h with PBS or HTRA1 prior to a 48 h co-culture without HTRA1. Mann-Whitney U test: without versus with HTRA1, *p = 0.0079; 2 h monocyte PBS versus 2 h monocyte HTRA1, †p = 0.0079; 2 h RPE HTRA1 versus non HTRA1 CTLm, not significantly different.

(E) Counts of CFSE-labeled mouse monocytes co-cultured during 48 h with RPE cells. Monocytes, were sorted from bone marrow of C57BL6/J mice (WT) or the indicated knockout mouse strains, and cultured with rHTRA1 or PBS. Mann-Whitney U test: PBS (WT) versus rHTRA1 (WT), *p = 0.0286; PBS (WT) versus PBS (CD47^{-/-}), †p = 0.0286; PBS (WT) versus PBS (Thbs1^{-/-}), ‡p = 0.0286; PBS (Thbs1^{-/-}) versus rHTRA1 (Thbs1^{-/-}), §p = 0.0206.

(F) Monocyte counts in RPE/human cH/cH-CD14⁺ monocyte co-cultures in which the monocytes were incubated for 30 min with PBS or HTRA1; followed by a 60 min incubation with PBS, TSP1,

or recombinant C-terminal domain of TSP1 (200 nM); before 48 h co-culture without additional treatment. Mann-Whitney U test: 30'PBS/60'PBS versus 30'HTRA1/60'PBS, *p = 0.0079; 30'HTRA1/60'PBS versus 30'HTRA1/60'TSP1, †p = 0.0079; 30'HTRA1/60'PBS versus 30'HTRA1/60'Cter, ‡p = 0.0159.

(G) Monocyte counts in 48 h co-cultures of RPE and human cH/cH CD14⁺ monocytes with PBS or HTRA1 treated with the indicated concentration of the control peptide, with 4N1K (a peptide derived from the Nter-proximal VVM site of TSP1) or a 4N1K bipeptide that we designed by linking two 4N1K peptides with an eight-glycine spacer. Mann-Whitney U test at each concentration between the CtrPep versus 4N1K-8G-4N1K (*p) and the CtrPep versus 4N1K (†p) are as follows: 200 nM, *p = 0.0028; 1 µM, *p < 0.0001; 5 µM, *p < 0.0001; 20 µM *p < 0.0001 and †p < 0.0001; at 50 µM *p < 0.0001 and †p < 0.0001.

(H) Representative micrographs of RPE flatmounts and quantification of subretinally adoptively transferred CFSE-stained bone marrow monocytes, 24 h after the injection in PBS with or without HTRA1 containing in addition TSP1 (80 nM), the control, or 4N1K bipeptide (150 µM), as indicated. Mann-Whitney U test: TSP1 versus PBS, *p = 0.0315; HTRA1+TSP versus TSP1, †p < 0.0001; HTRA1 versus PBS, ‡p = 0.0002; bi4N1K versus CtrBiPep, §p = 0.0044.

(I) Representative micrographs of RPE flatmounts and quantification of subretinally adoptively transferred CFSE-stained C57BL6/J and CD47^{-/-} bone-marrow

(legend continued on next page)

spacer to produce a 4N1K bi-peptide. The bi-peptide partially reversed the effect of HTRA1 on monocytes at 200 nM and completely inhibited it at 1 μ M in the culture, at 50-fold lower concentrations than the single 4N1K peptide. A control bi-peptide had no effect and an alternative bi-peptide using a polyethylene glycol spacer ($\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_7\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) gave similar results (Figure S3B).

In vivo, HTRA1 increased the 24 h survival of CFSE-stained mouse monocytes after injection to the immunosuppressive subretinal space, which normally induces their quick elimination (Levy et al., 2015) (quantified on RPE and retinal flatmounts) (Figure 3H). TSP1 addition promoted subretinal MP elimination, but TSP1 lost its immunosuppressive effect in the presence of HTRA1. Importantly, compared to control, the HTRA1-induced monocyte clearance deficit was completely reversed by the co-administration of the 4N1K bi-peptide (Figure 3H). Similar effects were observed by using freshly extracted brain microglial cells (Figure S3C). Conversely, HTRA1 had no effect on adoptively transferred CD47^{-/-} monocytes that resisted subretinal elimination similarly to HTRA1-treated wild-type monocytes and the elimination of CD47^{-/-} monocytes could not be accelerated by the 4N1K bi-peptide, confirming the specificity of the peptide (Figure 3I). Furthermore, subretinal IBA1⁺ MP accumulation (quantified on RPE and retinal flatmounts) in *Thsb1*^{-/-} mice, provoked by a 4-day light challenge calibrated to induce MP infiltration in inflammation prone *Thsb1*^{-/-} but not in wild-type mice (Calippe et al., 2017), was strongly repressed 2 days after subretinal injection of TSP1 compared with PBS (Figure 3I). Subretinal administration of HTRA1 in light-challenged *Thsb1*^{-/-} mice did not further increase the infiltrate, but again fully reversed TSP1's immunosuppressive effect. The CD47-activating 4N1K bi-peptide strongly induced MP elimination in the presence of HTRA1 (Figure 3J).

Collectively, the observations that HTRA1 blocked the anti-inflammatory effect of TSP1, that HTRA1 had a much reduced effect in the absence of TSP1 or CD47, that the 4N1K bi-peptide completely reversed the effect of HTRA1 at much lower concentrations than the mono-peptide but only in the presence of CD47, strongly suggests that HTRA1 inhibits monocyte and MP elimination predominantly by separating the two CD47-binding sites of TSP1, inhibiting CD47 signaling.

HTRA1-Induced Inhibition of CD47 Signaling Promotes Osteopontin Secretion

To identify potential HTRA1-induced downstream mediators of increased MP survival that were inhibited by CD47 signaling, we sequenced the transcriptome of early human monocyte-derived macrophages (cH/cH monocytes cultured for 6 h).

Compared with PBS controls, exogenous HTRA1 induced 1,699 protein coding transcripts (Figure 4A; Table S1). Interestingly, 1,267 of these mRNAs (74%) were repressed by simultaneous activation of CD47 (bi4N1K), suggesting that the inhibition of CD47 signaling participates in the induction of the majority of HTRA1-induced transcripts in early monocyte-derived macrophages. A comparison of the transcripts per million (TPMs) of the ten transcripts that were induced at least 16-fold (4 log2) by HTRA1 (HTRA1 versus control) and most repressed by 2.5 μ M bi4N1K revealed that colony stimulating factor 1 (*CSF1*) and osteopontin (*OPN*), were among the most regulated mRNAs (Figures 4B and S4A). Whereas CSF1 mainly increases the lifespan of resident macrophages (Hume and MacDonald, 2012; Lenzo et al., 2012), *OPN* promotes macrophage survival in inflammatory conditions (Brummer et al., 2003), including in the subretinal space (Fujita et al., 2011), making it a good candidate for a CD47-regulated MP survival factor. ELISA quantifications of supernatants from 24 h human monocyte-derived macrophages confirmed that HTRA1 robustly induced *OPN* secretion, which was strongly, but not entirely, repressed by the bi4N1K peptide (Figure 4C). In accordance with a CD47-dependent mechanism, cultured CD47^{-/-} bone marrow monocytes (BMMs) expressed *OPN* mRNA at higher amounts that did wild-type cells in 6 h BMM-derived macrophages (quantitative RT-PCRs) (Figure 4D). Importantly, at 18 h of macrophage differentiation, although the strain-dependent difference was reduced, the addition of HTRA1 to the culture induced a major 4-fold increase of *Opn* transcription in wild-type cells compared with a 1.5-fold increase in CD47^{-/-} macrophages, demonstrating the important role of CD47 in HTRA1-dependent *Opn* induction (Figure 4D). During un-stimulated, early human macrophage differentiation of blood monocytes (cH/cH), quantitative RT-PCRs revealed a transient induction of *TSP1* (from 3 to 16 h), followed by the induction of *HTRA1*, which preceded *OPN* induction (Figure 4E) (each in relation to the expression in fresh monocytes). Inhibition of HTRA1 by the inhibitor DPMFKLboroV (Truebestein et al., 2011) (which did not affect cell survival in culture, data not shown) dose-dependently reduced the subsequent *OPN* secretion in cH/cH macrophages at 72 h (Figure 4F), showing the importance of endogenous HTRA1 in the induction of *OPN*. Furthermore, in our human study groups (Figure 1), we demonstrated a significant positive correlation between HTRA1 transcription in fresh monocytes and *OPN* transcription at 24 h of culture (Figure 4G). Finally, mH/mH monocytes, expressing higher amounts of HTRA1 (Figure 1), also transcribed and secreted significantly more *OPN* at 24 h of culture than did cH/cH controls (Figures 4H and 4I) without affecting the secretion of other proteins typically secreted by MPs such as apolipoprotein E (Figure S4B). The

monocytes, 24 h after the injection in PBS with or without HTRA1 containing in the control, or 4N1K bi-peptide (150 μ M) as indicated. Mann-Whitney U test: CD47^{-/-} PBS versus C57/BL6/J PBS, *p = 0.0143; CD47^{-/-} PBS versus CD47^{-/-} HTRA1 and CD47^{-/-} bi4N1K versus CtrBiPep, not significant.

(J) Representative micrographs of IBA1-stained RPE flatmounts and quantification of IBA1⁺ MPs of *Thsb1*^{-/-} mice, exposed for 4 days to 4,500 lux of green light (which induces subretinal MP accumulation in these mice) sacrificed at day 6 after a subretinal injection at day 4 with 4 μ L of PBS with or without HTRA1 containing in addition TSP1 (80 nM), the control, or 4N1K bi-peptide (150 μ M) as indicated. Mann-Whitney U test: TSP1 versus PBS, *p < 0.0001; HTRA1+TSP versus TSP1, *p < 0.0001; HTRA1 versus PBS, *p = 0.139; bi4N1K versus CtrBiPep, *p = 0.0005

Data are represented as mean $\pm$ SEM. Abbreviations are as follows: ionized calcium-binding adaptor molecule 1, IBA1; transcription factor PU-1, PU-1; orthodenticle homeobox 2, OTX2; monocyte, Mo; retinal pigment epithelial cell, RPE; control immunoglobulin, cIgG; function-blocking CD36 antibody, aCD36; function-blocking CD47 antibody, aCD47; function-blocking TSP1 antibody, aTSP1; carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE; thrombospondin 1 gene, *Thbs1*; control peptide, CtrPep; control bi-peptide, CtrBiPep. n is indicated in each column except for in (B) (n = 6 per group); n is the number of independent wells or injected eyes. Scale bar, 50 μ m.

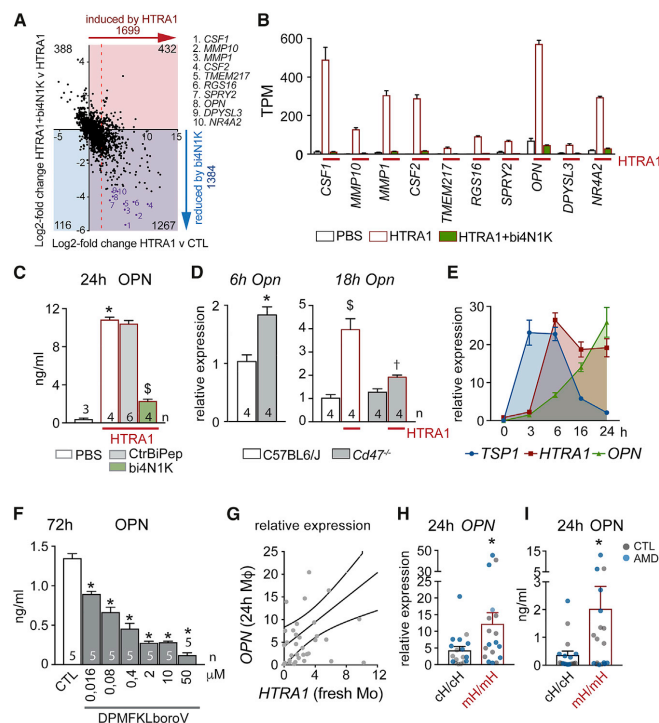


Figure 4. HTRA1-Induced Inhibition of CD47 Signaling Promotes Osteopontin Secretion

(A) Scatter dot plot of the 2,202 protein coding mRNAs with a TPM greater than 25 in the HTRA1 group and a false discovery rate (FDR) smaller than 0.01 regulated by HTRA1 in 6 h human cH/cH CD14⁺ monocyte culture. The transcripts are plotted according to their log₂-fold induction by HTRA1 (x axis) and their log₂-fold repression by 2.5 μM bi4N1K in the presence of HTRA1 (y axis). The number of transcripts of each quadrant, HTRA1-induced transcripts (red) and transcripts repressed by bi4N1K in the presence of HTRA1 (blue) are indicated. The ten dots representing transcripts that were induced at least 16-fold (4 log₂) by HTRA1 (HTRA1 versus control) and most repressed by 2.5 μM bi4N1K are indicated and listed.

(B) TPMs of the ten top regulated mRNAs in human monocytes cultured for 6 h with PBS, HTRA1, and HTRA1 and 2.5 μM bi4N1K peptide. (n = 3 per group; for p values see Figure S4A).

(C) Osteopontin concentrations in supernatants (ELISA) from 24 h human cH/cH CD14⁺ monocyte-derived macrophages cultured with PBS, HTRA1, and the peptides (2.5 μM) as indicated. (n is indicated in column) Mann-Whitney U test: PBS versus HTRA1, *p < 0.0001; bi4N1K versus CtrlBip *p = 0.0095.

(D) Quantitative RT-PCR of S26mRNA-normalized *Opn* mRNA expression in 6 h and 18 h C57BL6/J and *Cd47*^{-/-} bone-marrow monocyte-derived macrophages stimulated with HTRA1 as indicated (n = 4). Mann-Whitney U test: C57BL6/J versus *Cd47*^{-/-}, *p = 0.0002; non- versus HTRA1-stimulated C57BL6/J and *Cd47*^{-/-} cells, §p and §p = 0.0286, respectively.

(E) Quantitative RT-PCR of *TSP1*, *HTRA1*, and *OPN* mRNA of fresh, sorted human cH/cH CD14⁺ monocytes at the indicated time points (n = 5 per group; relative expression to 0 h).

(F) ELISA quantification of OPN in supernatants of 72 h human cH/cH monocyte-derived macrophage cultures treated with the indicated concentrations of the HTRA1 inhibitor DPMFKLboroV (n = 5). Mann-Whitney U test versus control, *p < 0.0001.

(G) Linear regression of the correlation of *HTRA1* mRNA (x axis) of fresh, sorted CD14⁺ monocytes with their *OPN* mRNA expression in 24 h monocyte-derived macrophages (y axis) from all study participants (n = 36). Three data points are outside the graph to better visualize the majority of points; dotted lines represent 95% confidence bands of the continuous regression line; slope 1.36 ± 0.4235 ; p = 0.0029 deviant from zero; R² = 23%.

(H) Quantitative RT-PCR of normalized *OPN* mRNA of 24 h monocyte-derived macrophages of cH/cH and mH/mH donors (n = 18 per group). Student's t test, *p = 0.0155; Mann-Whitney U test, §p = 0.0218.

(I) ELISA quantification of OPN and APOE concentrations of supernatants of 24 h human monocyte cultures from cH/cH and mH/mH donors (n = 17 per group). Student's t test, *p = 0.0244; Mann-Whitney U test, §p = 0.0477.

Data are represented as mean ± SEM. Abbreviations are as follows: transcripts per million, TPM; colony stimulating factor, CSF; matrix metalloproteinase, MMP; transmembrane protein, TMEM; regulator of G protein signaling 16, RGS16; sprouty RTK signaling antagonist 2, SPRY2; dihydropyrimidinase like 3, DPYSL3; nuclear receptor subfamily 4 group A member 2, NR4A2; osteopontin, OPN; thrombospondin, TSP1; bi-peptide formed by two 4N1K peptides linked by an eight glycine spacer, bi4N1K; control bi-peptide, CtrlBip; homozygous common haplotype carriers, cH/cH; minor AMD-risk haplotype carriers, mH/mH; healthy control subject, CTL; patient with age-related macular degeneration, AMD.

AMD-associated CFH(H402) variant was not associated with differences in OPN expression (Figure S4C), in accordance with previously reported low CFH expression in monocyte and the observation that CFH(H402) inhibits the subretinal elimination of microglial cells, but not monocytes, more potently than the common CFH(Y402) (Calippe et al., 2017). A multiplexed ELISA analysis of the supernatants also revealed that mH/mH monocyte-derived macrophages secreted more CCL2 than did cH/cH controls (Figure 4SD), likely contributing to increased inflammation. Its transcript was also induced by recombinant HTRA1 in our transcriptome analysis, but

not reduced by bi4N1K, pointing to a TSP1-independent mechanism.

Altogether, our data suggest that HTRA1 induces OPN in part because of the inhibition of CD47 signaling and demonstrates the importance of HTRA1 in the induction of OPN in MPs and the role of CD47 activation in its repression.

Inhibition of Osteopontin Reverses HTRA1-Induced MP Survival

We next evaluated whether the HTRA1-induced increase in MP survival was dependent on OPN induction. Quantification of

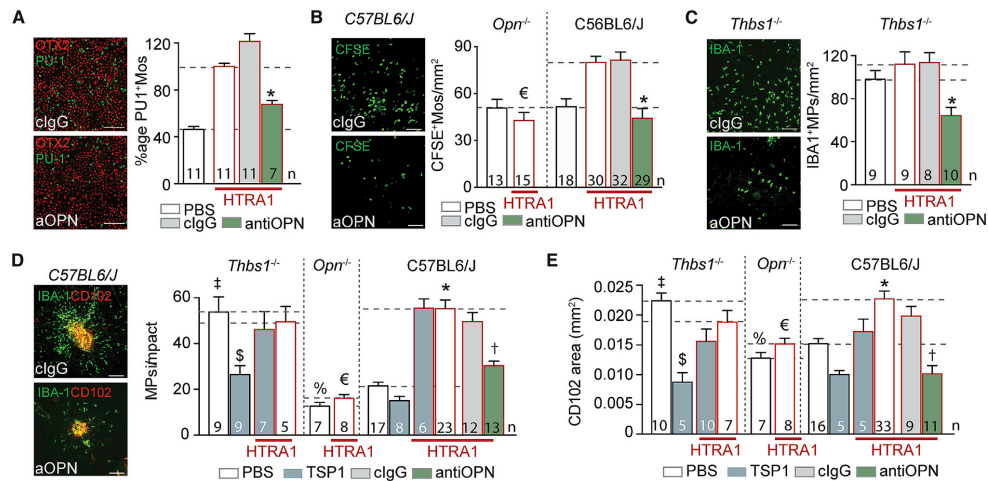


Figure 5. Inhibition of Osteopontin Reverses HTRA1-Induced MP Survival

(A) Representative micrographs of PU.1-labeled (myeloid nuclear marker, green) and OTX2-labeled (RPE nuclear marker, red) cells after human monocytes were co-cultured for 48 h with primary RPE cells with or without exogenous HTRA1 (5 μ g/mL) in the culture medium in addition to aOPN (50 μ g/mL) or the control IgG (50 μ g/mL) as indicated and quantification of PU.1⁺ monocyte cell density at 48 h after the co-culture in the indicated condition (aOPN; 50 μ g/mL) and quantification of PU.1⁺ monocytes at 48 h after the co-culture of the indicated groups. Mann-Whitney U test: aOPN versus clgG, * p = 0.0025.

(B) Representative micrographs and cell density quantification of subretinal CFSE⁺ mouse C56BL/6J and *Opn*^{-/-} monocytes, 24 h after subretinal adoptive transfer to wild-type recipients in PBS or PBS with HTRA1 (100 μ g/mL), additionally to aOPN (10 μ g/mL) or the control clgG (10 μ g/mL) as indicated. Mann-Whitney U test: HTRA1 *Opn*^{-/-} versus HTRA1 C56BL/6J, * p < 0.0001; aOPN versus clgG, * p < 0.0001.

(C) Representative pictures of IBA1-stained RPE flatmounts MPs of *Thbs1*^{-/-} mice, exposed for 4 days to 4,500 lux of green light sacrificed at day 6 after subretinal injection at day 4 of 4 μ L of PBS containing HTRA1 (100 μ g/mL) with either clgG or aOPN (10 μ g/mL) and quantification of IBA1⁺ MPs of the indicated groups. Mann-Whitney U test: HTRA1+aOPN versus HTRA1+clgG, * p < 0.0001.

(D and E) Representative micrographs of RPE flatmounts of CD102 (red) and IBA1 (green) immunohistochemistry 10 days after laser injury (D). The mice were intravitreally injected at day 4 and day 7 with 2 μ L of PBS or PBS containing HTRA1 (100 μ g/mL) in addition to the (10 μ g/mL) or the control IgG (10 μ g/mL). Quantification of subretinal IBA1⁺ MPs situated on the RPE were counted at a distance of 0–500 μ m from CD102⁺ CNV (D) and quantification of the CD102⁺ area (E) of *Thbs1*^{-/-}, *Opn*^{-/-}, and wild-type C57BL/6J mice injected with the indicated compounds following the same protocol. Mann-Whitney U test: PBS *Thbs1*^{-/-} versus PBS C57BL/6J, * p = 0.0002 in (D) and * p = 0.0160 in (E); TSP1 *Thbs1*^{-/-} versus PBS *Thbs1*^{-/-}, * p = 0.0028 in (D) and * p = 0.0007 in (E); PBS *Opn*^{-/-} versus PBS C57BL/6J, * p = 0.003 in (D) and * p = 0.0413 in (E); PBS *Opn*^{-/-} versus HTRA1 *Opn*^{-/-}, * p = 0.1294 in (D) and * p = 0.0939 in (E); HTRA1 C57BL/6J versus PBS C57BL/6J, * p < 0.0001 in (D) and (E); aOPN versus clgG * p < 0.0001 in (D) and (E).

Data are represented as mean $\pm$ SEM. Abbreviations are as follows: thrombospondin 1 gene, *Thbs1*; thrombospondin 1, TSP1; Osteopontin gene, *Opn*; control IgG, clgG; anti-osteopontin antibody, aOPN. n indicates number of eyes. Scale bar, 20 μ m.

PU.1 (green), OTX.2 (red) immune-stained co-cultures of monocytes and RPE revealed that a function-blocking anti-human OPN antibody reversed the HTRA1-induced increase of surviving PU.1⁺ monocytes at 48 h compared with the control antibody (Figure 5A). In mice, adoptively transferred CFSE-stained C57BL/6J and *Opn*^{-/-} monocytes were eliminated similarly 24 h after subretinal injection, but contrary to wild-type monocytes, HTRA1 did not increase the number of *Opn*^{-/-} monocytes and a function blocking anti-mouse OPN antibody fully prevented the HTRA1-induced increase in wild-type monocytes (Figure 5B). The same antibody injected subretinally to light-challenged *Thbs1*^{-/-} mice reduced the number of IBA1⁺ MPs at 48 h compared with in the control immunoglobulin (IgG) (Figure 5C).

In laser-induced subretinal inflammation and choroidal neovascularization (CNV), the classic model of wet AMD, HTRA1 again increased the number of MPs surrounding the lesions

and increased CNV in wild-type mice, quantified 10 days after the injury on flatmounts stained for IBA1⁺ MPs (green) and CD102⁺ vascular endothelial cells (red) (Figures 5D and 5E). HTRA1 was injected intravitreally at day 4 after injury (peak MP accumulation, which are in part monocyte-derived macrophages) (Figure S5) and at day 7 (resolution phase) (Lavalette et al., 2011). HTRA1 had no effect on the increased inflammation and CNV observed in *Thbs1*^{-/-} mice, confirming that the pro-inflammatory effect of HTRA1 during the resolution phase is mainly dependent on the presence of TSP1. TSP1, injected on the same days, strongly reduced the inflammation and CNV in particular in *Thbs1*^{-/-} mice, but was inefficient when co-injected with HTRA1. *Opn*^{-/-} mice displayed slightly reduced subretinal MP infiltration, and HTRA1 injections only led to a minor increase of the subretinal MP population and CNV size in *Opn*^{-/-} mice compared with that of wild-type mice (Figures 5D and 5E). Finally, the HTRA1-induced increase in subretinal MP



accumulation, as well as the increase in CNV formation, was efficiently reduced by the function-blocking OPN antibody (Figure 5 D and E). These data highlight the involvement of OPN in HTRA1-mediated MP survival.

DISCUSSION

Chronic inflammation and accumulation of MPs characterizes all forms of AMD. Here, we examined how a genetic predisposing factor, the 10q26 risk haplotype, promotes destructive inflammation in AMD. We found that circulating monocytes, which infiltrate the subretinal space in AMD alongside displaced resident macrophages (Sennlaub et al., 2013), expressed high amounts of HTRA1, in accordance with open chromatin sites in the HTRA1 promoter region in monocytes. Our analysis of monocytes from 18 common haplotype carriers (cH/cH) and 18 mH/mH carriers, who are at ~10-fold increased risk of developing late AMD (Chen et al., 2009; Rivera et al., 2005), revealed an association between the mH haplotype and increased *HTRA1* mRNA expression in monocytes and HTRA1 secretion in early monocyte-derived macrophages. mH showed little influence on *PLEKHA1* expression, whereas *ARMS2* mRNA was not detected in monocytes. Our findings establish the association of mH with increased HTRA1 in monocytes, a relevant cell type in AMD. mH might have a similar effect on RPE and other MPs such as microglial cells, given that an increase was observed in a number of other tissues analyzed in the GTEx database (~10 mH/mH and ~90 cH/cH carriers) (Liao et al., 2017). Independently of the haplotype, HTRA1 located to activated MPs in AMD donor eyes, akin to arthritis (Hou et al., 2014; Milner et al., 2008), which might explain the increased aqueous humor HTRA1 concentrations in AMD patients in general (Tosi et al., 2017).

Functionally, HTRA1 lowered the susceptibility of MPs to be eliminated by immunosuppressive signals from the RPE in (1) a co-culture model with human and murine monocytes, (2) subretinal adoptive transfer in mice, and (3) mouse models of laser- and light-induced subretinal inflammation *in vivo*. This effect of HTRA1 on MP elimination was largely dependent on the presence of TSP1, an inhibitor of MP accumulation and CNV (Calippe et al., 2017; Ng et al., 2009; Wang et al., 2012), because HTRA1 had little effect on *Thbs1*^{-/-} and *CD47*^{-/-} mice. The fact that the CD47 agonist peptides were sufficient to completely antagonize the HTRA1-induced increased monocyte survival strongly suggested that TSP1 degradation leading to the incapacity to activate CD47 is the predominant mechanism by which HTRA1 disrupts subretinal immune suppression.

Indeed, our analysis of HTRA1-hydrolyzed TSP1 fragments, from full-length TSP1 and its C-terminal domain, localized the two major cleavage sites between the two CD47-binding VVM motifs. HTRA1 hydrolysis of TSP1 reduced its ability to form CD47-CD47 complexes, which are important for CD47 activation: TSP1 lacking one of the VVM sites (McDonald et al., 2003) and TSP2 with only one VVM site (Isenberg et al., 2009) do not efficiently activate CD47. Indeed, our 4N1K bi-peptides were 50-fold more efficient than mono-peptides to antagonize the effect of HTRA1 in the culture, confirming that the separation of the VVM sites by HTRA1 is likely sufficient to dramatically reduce TSP1's ability to activate CD47. Interestingly, the well-described

HTRA1-induced inhibition of TGF- β signaling (Clausen et al., 2011) did not play a role in HTRA1-induced subretinal MP accumulation in accordance with the observation that HTRA1 and TGF- β both promote CNV (Wang et al., 2017).

Mechanistically, we show that HTRA1 induced OPN, a pro-inflammatory cytokine that promotes macrophage survival (Brummer et al., 2003; Lund et al., 2009) and is increased in AMD donor tissue (Newman et al., 2012). Inhibition of endogenous HTRA1 reduced OPN secretion from macrophages, and the OPN induction by exogenous HTRA1 was to a large part repressed by CD47 activation in human macrophages. In mice, HTRA1-induced *Opn* expression in macrophages was much reduced in *CD47*^{-/-} cells compared with those of wildtype. Together, these results suggest that TSP1 degradation and loss of CD47 signaling plays a major role in OPN induction in macrophages. Experimentally, OPN was necessary for HTRA1's pro-inflammatory effect as *Opn* deletion and inhibition blocked HTRA1-induced MP persistence. Clinically, macrophages from 10q26 AMD-risk mH/mH carriers also secreted higher amounts of OPN than did cH/cH macrophages, suggesting that the risk-haplotype-associated *HTRA1* increase is sufficient to promote OPN secretion.

Altogether our study shows that the increased HTRA1 expression in monocytes and monocyte-derived macrophages, associated with the AMD-risk mH of the 10q26 locus, hydrolyzes TSP1's C-terminal domain, compromising its ability to activate CD47 and repress the MP survival factor OPN. Increased HTRA1 and OPN expression in MPs of mH 10q26 locus carriers thereby promote a stronger inflammatory reaction and might in our evolutionary past have increased fitness toward infectious diseases, which could explain its high frequency today. In AMD, the stronger pathogenic inflammatory reaction might explain the indiscriminate association of the mH with all disease forms (Fritsche et al., 2013) because subretinal inflammation is observed in early and both late forms of AMD (Guillonneau et al., 2017). Interestingly, the AMD-associated CFH(H402) also inhibits CD47 and promotes pathogenic subretinal inflammation (Calippe et al., 2017), which might be the reason for both variants to be similarly associated with all forms of AMD (Fritsche et al., 2013). Current anti-inflammatory therapies, such as steroids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) paradoxically stimulate pro-inflammatory HTRA1 expression (Spugnini et al., 2006; van de Garde et al., 2014), which might account for their lack of therapeutic effect in AMD.

Our findings describe a comprehensive mechanism of how the predominant 10q26 AMD-risk haplotype promotes AMD pathogenesis. Our study provides rational for targeting HTRA1 and OPN or pharmacological activation of CD47 to induce the resolution of subretinal chronic inflammation that leads to irreversible blindness in AMD.

LIMITATIONS OF STUDY

In our study of changes associated with the 10q26 AMD-risk haplotype, we focused on the evaluation of monocytes, which infiltrate the subretinal space in AMD alongside displaced resident macrophages (Sennlaub et al., 2013). Future studies will show whether the AMD-risk haplotype also affects gene expression in other immune cells implicated in AMD pathogenesis such

as resident choroidal macrophages, microglial cells, or mast cells. It is also not yet clear to what degree endogenous HTRA1 hydrolyses TSP1 inside the monocyte-derived cells or mainly after secretion of both molecules. This question might have important therapeutic implications as non-cell-penetrating HTRA1 inhibitors will not affect intracellular TSP1 degradation. On a similar note, our evaluation of the effect of HTRA1 was mainly based on the short-term addition of exogenous HTRA1. Hereafter, using transgenic overexpression in animal models, it will be important to evaluate the consequences of chronic HTRA1 overexpression in monocytes and other mononuclear phagocytes and to compare the effect to overexpression in non-immune cells such as RPE and photoreceptors, which produces an AMD-like phenotype (Iejima et al., 2015; Jones et al., 2011; Oura et al., 2018).

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- **KEY RESOURCES TABLE**
- **RESOURCE AVAILABILITY**
 - Lead Contact
 - Materials availability and Data and Code Availability
- **EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**
 - Animals
 - Primary cells
- **METHOD DETAILS**
 - Search for open chromatin and transcription factor binding sites
 - Human blood monocyte isolation and culture, RNA extraction, RT-PCR and Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Milliplex magnetic bead analysis
 - Gene expression analysis
 - Donor eyes and immunohistochemistry
 - Synthesis of recombinant TSP1 Cter domain (rCter)
 - *In vitro* digestion of recombinant TSP1 and its C-terminal domain by HTRA1
 - Silver nitrate staining and western blot fragment analysis
 - Mass spectrometry
 - CD47V5 CD47Myc proximity ligation assay
 - RPE Monocyte Co-culture (Mathis et al., 2017)
 - QPCR on bone marrow-derived Monocyte (BMM) mono-culture
 - Subretinal adoptive mononuclear phagocyte transfer and clearance (Calippe et al., 2017; Levy et al., 2015)
 - *In vivo* laser-injury (Lavalette et al., 2011) and light-challenge experiments (Hu et al., 2015; Levy et al., 2015)
- **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**
 - Gene expression analysis
 - Analyze of the CD47V5 CD47Myc proximity ligation assay
 - Quantification of RPE/Monocyte Co-culture
 - Quantification in laser-injury and light-challenge model
 - Statistical analysis

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.021>.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, France) and grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR, France): ANR Geno 2009 (R09099DS) and ANR MACLEAR (ANR-15-CE14-0015-01). The work was supported by the Programme Investissements d'Avenir LABEX LIFESENSES [ANR-10-LABX-65] and IHU FOReSIGHT [ANR-18-IAHU-0001] (France), the Carnot Institute (France), and a generous donation by Doris and Michael Bunte.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, F.S., F. Beguier, M.H., and C.R.; Investigation, F. Beguier, M.H., C.R., S.A., Y.Z., C.N., T.M., C.E., M.B., A.D.-M., W.C., S.C., S.T., G.B., J.-B.C., H.C.-M., A.P., J.-F.G., M.P., F. Blond, T.L., J.-E.R., C.D., X.G., and F.S.; Writing – Original Draft, F.S., F. Beguier, M.H., C.R., C.D., X.G., and P.S.; Writing– Review & Editing, F.S.; Funding Acquisition, F.S. and J.-A.S.; Resources, E.K.; Supervision, F.S. and X.G.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: March 12, 2019

Revised: March 6, 2020

Accepted: July 24, 2020

Published: August 18, 2020

SUPPORTING CITATIONS

The following references appear in the Supplemental Information: Liu et al., 2013; Luhmann et al., 2009; Robbie et al., 2016; Sakurai et al., 2003; Shi et al., 2011; Streilein et al., 2002; Tsutsumi et al., 2003.

REFERENCES

- An, E., Sen, S., Park, S.K., Gordish-Dressman, H., and Hathout, Y. (2010). Identification of novel substrates for the serine protease HTRA1 in the human RPE secretome. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 3379–3386.
- Bruemmer, D., Collins, A.R., Noh, G., Wang, W., Territo, M., Arias-Magallona, S., Fishbein, M.C., Blaschke, F., Kintscher, U., Graf, K., et al. (2003). Angiotensin II-accelerated atherosclerosis and aneurysm formation is attenuated in osteopontin-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 112, 1318–1331.
- 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, 261–272.
- Chamberland, A., Wang, E., Jones, A.R., Collins-Racie, L.A., LaVallie, E.R., Huang, Y., Liu, L., Morris, E.A., Flannery, C.R., and Yang, Z. (2009). Identification of a novel Htra1-susceptible cleavage site in human aggrecan: evidence for the involvement of Htra1 in aggrecan proteolysis in vivo. *J. Biol. Chem.* 284, 27352–27359.
- Chen, W., Xu, W., Tao, Q., Liu, J., Li, X., Gan, X., Hu, H., and Lu, Y. (2009). Meta-analysis of the association of the HTRA1 polymorphisms with the risk of age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* 89, 292–300.
- Chen, C.Y., Melo, E., Jakob, P., Friedlein, A., Elsässer, B., Goettig, P., Kueppers, V., Delobel, F., Stucki, C., Dunkley, T., et al. (2018). N-Terminomics identifies Htra1 cleavage of thrombospondin-1 with generation of a proangiogenic fragment in the polarized retinal pigment epithelial cell model of age-related macular degeneration. *Matrix Biol.* 70, 84–101.
- Chowers, I., Meir, T., Lederman, M., Goldenberg-Cohen, N., Cohen, Y., Banin, E., Averbukh, E., Hemo, I., Pollack, A., Axer-Siegel, R., et al. (2008). Sequence



- variants in HTRA1 and LOC387715/ARMS2 and phenotype and response to photodynamic therapy in neovascular age-related macular degeneration in populations from Israel. *Mol. Vis.* 14, 2263–2271.
- Clausen, T., Kaiser, M., Huber, R., and Ehrmann, M. (2011). HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 152–162.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21.
- Eigenbrot, C., Ullsch, M., Lipari, M.T., Moran, P., Lin, S.J., Ganesan, R., Quan, C., Tom, J., Sandoval, W., van Lookeren Campagne, M., and Kirchhofer, D. (2012). Structural and functional analysis of HtrA1 and its subdomains. *Structure* 20, 1040–1050.
- 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.
- Fujita, N., Fujita, S., Ogata, N., Matsuoka, M., Okada, Y., Kon, S., Ueda, T., and Saika, S. (2011). Endogenous osteopontin involvement in laser-induced choroidal neovascularization in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 9310–9315.
- Grau, S., Baldi, A., Bussani, R., Tian, X., Stefanescu, R., Przybylski, M., Richards, P., Jones, S.A., Shridhar, V., Clausen, T., and Ehrmann, M. (2005). Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 6021–6026.
- Guillonnet, 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.
- Hou, Y., Lin, H., Zhu, L., Liu, Z., Hu, F., Shi, J., Yang, T., Shi, X., Guo, H., Tan, X., et al. (2014). The inhibitory effect of IFN- γ on protease HTRA1 expression in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 193, 130–138.
- 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.
- Hume, D.A., and MacDonald, K.P. (2012). Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. *Blood* 119, 1810–1820.
- Iejima, D., Nakayama, M., and Iwata, T. (2015). HTRA1 Overexpression Induces the Exudative Form of Age-related Macular Degeneration. *J. Stem Cells* 10, 193–203.
- Isenberg, J.S., Annis, D.S., Pendrak, M.L., Ptaszynska, M., Frazier, W.A., Mosher, D.F., and Roberts, D.D. (2009). Differential interactions of thrombospondin-1, -2, and -4 with CD47 and effects on cGMP signaling and ischemic injury responses. *J. Biol. Chem.* 284, 1116–1125.
- Jones, A., Kumar, S., Zhang, N., Tong, Z., Yang, J.H., Watt, C., Anderson, J., Amrita, Fillerup, H., McCloskey, M., et al. (2011). Increased expression of multifunctional serine protease, HTRA1, in retinal pigment epithelium induces polypoidal choroidal vasculopathy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 14578–14583.
- Kanda, A., Stambolian, D., Chen, W., Curcio, C.A., Abecasis, G.R., and Swaroop, A. (2010). Age-related macular degeneration-associated variants at chromosome 10q26 do not significantly alter ARMS2 and HTRA1 transcript levels in the human retina. *Mol. Vis.* 16, 1317–1323.
- Lavalette, S., Raoul, W., Houssier, M., Camelo, S., Levy, O., Calippe, B., Jonet, L., Behar-Cohen, F., Chemtob, S., Guillonnet, X., et al. (2011). Interleukin-1 β inhibition prevents choroidal neovascularization and does not exacerbate photoreceptor degeneration. *Am. J. Pathol.* 178, 2416–2423.
- Lenzo, J.C., Turner, A.L., Cook, A.D., Vlahos, R., Anderson, G.P., Reynolds, E.C., and Hamilton, J.A. (2012). Control of macrophage lineage populations by CSF-1 receptor and GM-CSF in homeostasis and inflammation. *Immunol. Cell Biol.* 90, 429–440.
- 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. (2015). Apolipoprotein E promotes subretinal mononuclear phagocyte survival and chronic inflammation in age-related macular degeneration. *EMBO Mol. Med.* 7, 211–226.
- Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923–930.
- Liao, S.M., Zheng, W., Zhu, J., Lewis, C.A., Delgado, O., Crowley, M.A., Buchanan, N.M., Jaffee, B.D., and Dryja, T.P. (2017). Specific correlation between the major chromosome 10q26 haplotype conferring risk for age-related macular degeneration and the expression of *HTRA1*. *Mol. Vis.* 23, 318–333.
- Lin, M.K., Yang, J., Hsu, C.W., Gore, A., Bassuk, A.G., Brown, L.M., Colligan, R., Sengillo, J.D., Mahajan, V.B., and Tsang, S.H. (2018). HTRA1, an age-related macular degeneration protease, processes extracellular matrix proteins EFEMP1 and TSP1. *Aging Cell* 17, e12710.
- Liu, J., Copland, D.A., Horie, S., Wu, W.K., Chen, M., Xu, Y., Paul Morgan, B., Mack, M., Xu, H., Nicholson, L.B., and Dick, A.D. (2013). Myeloid cells expressing VEGF and arginase-1 following uptake of damaged retinal pigment epithelium suggests potential mechanism that drives the onset of choroidal angiogenesis in mice. *PLoS ONE* 8, e72935.
- Lorenzi, M., Lorenzi, T., Marzetti, E., Landi, F., Vetrano, D.L., Settanni, S., Antocicco, M., Bonassi, S., Valdiglesias, V., Bernabei, R., and Onder, G. (2016). Association of frailty with the serine protease HtrA1 in older adults. *Exp. Gerontol.* 81, 8–12.
- Luhmann, U.F., Robbie, S., Munro, P.M., Barker, S.E., Duran, Y., Luong, V., Fitzke, F.W., Bainbridge, J.W., Ali, R.R., and MacLaren, R.E. (2009). The drusenlike phenotype in aging Ccl2-knockout mice is caused by an accelerated accumulation of swollen autofluorescent subretinal macrophages. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 5934–5943.
- Lund, S.A., Giachelli, C.M., and Scatena, M. (2009). The role of osteopontin in inflammatory processes. *J. Cell Commun. Signal.* 3, 311–322.
- 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.
- Martinez-Torres, A.C., Quiney, C., Attout, T., Boulet, H., Herbi, L., Vela, L., Barbier, S., Chateau, D., Chapiro, E., Nguyen-Khac, F., et al. (2015). CD47 agonist peptides induce programmed cell death in refractory chronic lymphocytic leukemia B cells via PLC γ 1 activation: evidence from mice and humans. *PLoS Med.* 12, e1001796.
- 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.
- Mattapallil, M.J., Wawrousek, E.F., Chan, C.C., Zhao, H., Roychoudhury, J., Ferguson, T.A., and Caspi, R.R. (2012). The Rd8 mutation of the Crb1 gene is present in vendor lines of C57BL/6N mice and embryonic stem cells, and confounds ocular induced mutant phenotypes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 2921–2927.
- McDonald, J.F., Dimitry, J.M., and Frazier, W.A. (2003). An amyloid-like C-terminal domain of thrombospondin-1 displays CD47 agonist activity requiring both VVM motifs. *Biochemistry* 42, 10001–10011.
- 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.
- Milner, J.M., Patel, A., and Rowan, A.D. (2008). Emerging roles of serine proteinases in tissue turnover in arthritis. *Arthritis Rheum.* 58, 3644–3656.
- 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., and Radeke, M.J. (2012). Systems-level analysis of age-related macular

- pdegeneration reveals global biomarkers and phenotype-specific functional networks.
- Genome Med.*
- 4, 16.
- Ng, T.F., Turpie, B., and Masli, S. (2009). Thrombospondin-1-mediated regulation of microglia activation after retinal injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 5472–5478.
- O’Koren, E.G., Yu, C., Klingeborn, M., Wong, A.Y.W., Prigge, C.L., Mathew, R., Kalnitsky, J., Msallam, R.A., Silvén, A., Kay, J.N., et al. (2019). Microglial Function Is Distinct in Different Anatomical Locations during Retinal Homeostasis and Degeneration. *Immunity* 50, 723–737.
- Oura, Y., Nakamura, M., Takigawa, T., Fukushima, Y., Wakabayashi, T., Tsujikawa, M., and Nishida, K. (2018). High-Temperature Requirement A 1 Causes Photoreceptor Cell Death in Zebrafish Disease Models. *Am. J. Pathol.* 188, 2729–2744.
- Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D.J., Inuganti, A., Griss, J., Mayer, G., Eisenacher, M., et al. (2019). The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* 47 (D1), D442–D450.
- Quesada, A.J., Nelius, T., Yap, R., Zaichuk, T.A., Alfranca, A., Filleur, S., Volpert, O.V., and Redondo, J.M. (2005). In vivo upregulation of CD95 and CD95L causes synergistic inhibition of angiogenesis by TSP1 peptide and metronomic doxorubicin treatment. *Cell Death Differ.* 12, 649–658.
- Rivera, A., Fisher, S.A., Fritsche, L.G., Keilhauer, C.N., Lichtner, P., Meitinger, T., and Weber, B.H. (2005). Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3227–3236.
- Robbie, S.J., Georgiadis, A., Barker, S.E., Duran, Y., Smith, A.J., Ali, R.R., Luhmann, U.F.O., and Bainbridge, J.W. (2016). Enhanced Ccl2-Ccr2 signaling drives more severe choroidal neovascularization with aging. *Neurobiol. Aging* 40, 110–119.
- Sakurai, E., Anand, A., Ambati, B.K., van Rooijen, N., and Ambati, J. (2003). Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 3578–3585.
- Sarks, S.H. (1976). Ageing and degeneration in the macular region: a clinicopathological study. *Br. J. Ophthalmol.* 60, 324–341.
- 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.
- Shi, Y.Y., Wang, Y.S., Zhang, Z.X., Cai, Y., Zhou, J., Hou, H.Y., and van Rooijen, N. (2011). Monocyte/macrophages promote vasculogenesis in choroidal neovascularization in mice by stimulating SDF-1 expression in RPE cells. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 249, 1667–1679.
- Spugnini, E.P., Cardillo, I., Verdina, A., Crispi, S., Saviozzi, S., Calogero, R., Nebbioso, A., Altucci, L., Cortese, G., Galati, R., et al. (2006). Piroxicam and cisplatin in a mouse model of peritoneal mesothelioma. *Clinical cancer research* 12, 6133–6143.
- Streilein, J.W., Ma, N., Wenkel, H., Ng, T.F., and Zamiri, P. (2002). Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Res.* 42, 487–495.
- Tosi, G.M., Caldi, E., Neri, G., Nuti, E., Marigliani, D., Baiocchi, S., Traversi, C., Cevenini, G., Tarantello, A., Fusco, F., et al. (2017). HTRA1 and TGF- β 1 Concentrations in the Aqueous Humor of Patients With Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58, 162–167.
- Truebestein, L., Tennstaedt, A., Mönig, T., Krojer, T., Canellas, F., Kaiser, M., Clausen, T., and Ehrmann, M. (2011). Substrate-induced remodeling of the active site regulates human HTRA1 activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 386–388.
- Tsutsui, C., Sonoda, K.H., Egashira, K., Qiao, H., Hisatomi, T., Nakao, S., Ishibashi, M., Charo, I.F., Sakamoto, T., Murata, T., and Ishibashi, T. (2003). The critical role of ocular-infiltrating macrophages in the development of choroidal neovascularization. *J. Leukoc. Biol.* 74, 25–32.
- van de Garde, M.D., Martínez, F.O., Melgert, B.N., Hylkema, M.N., Jonkers, R.E., and Hamann, J. (2014). Chronic exposure to glucocorticoids shapes gene expression and modulates innate and adaptive activation pathways in macrophages with distinct changes in leukocyte attraction. *J. Immunol.* 192, 1196–1208.
- Wang, S., Sorenson, C.M., and Sheibani, N. (2012). Lack of thrombospondin 1 and exacerbation of choroidal neovascularization. *Arch. Ophthalmol.* 130, 615–620.
- Wang, X., Ma, W., Han, S., Meng, Z., Zhao, L., Yin, Y., Wang, Y., and Li, J. (2017). TGF- β participates choroid neovascularization through Smad2/3-VEGF/TNF- α signaling in mice with Laser-induced wet age-related macular degeneration. *Sci. Rep.* 7, 9672.
- Wong, W.L., Su, X., Li, X., Cheung, C.M., 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. Health* 2, e106–e116.
- 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* 314, 992–993.
- Yehualaeshet, T., O’Connor, R., Green-Johnson, J., Mai, S., Silverstein, R., Murphy-Ullrich, J.E., and Khalil, N. (1999). Activation of rat alveolar macrophage-derived latent transforming growth factor beta-1 by plasmin requires interaction with thrombospondin-1 and its cell surface receptor, CD36. *Am. J. Pathol.* 155, 841–851.



STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Rabbit polyclonal anti-HTRA1	Abcam	Cat#ab38611; RRID: AB_733053
Goat polyclonal anti-IBA1	Abcam	Cat#ab5076; RRID: AB_2224402
Goat polyclonal anti-TSP1	Abcam	Cat#ab111230; RRID: AB_10867429
Monoclonal anti-FLAG® M2 antibody	Sigma-Aldrich	Cat#F3165; RRID: AB_259529
Duolink <i>In Situ</i> PLA Probe anti-Rabbit PLUS antibody	Sigma-Aldrich	Cat#DUO92002; RRID: AB_2810940
Duolink <i>In Situ</i> PLA Probe anti-Mouse MINUS Antibody	Sigma-Aldrich	Cat#DUO92004; RRID: AB_2713942
Mouse Monoclonal anti-V5 Tag	Thermo Fisher Scientific	Cat#R960-25; RRID: AB_2556564
Rabbit polyclonal anti-Myc tag	Abcam	Cat#ab9106; RRID: AB_307014
Mouse monoclonal anti-CD36	Abcam	Cat#ab17044; RRID: AB_443600
Mouse monoclonal anti-CD47	Abcam	Cat#ab3283; RRID: AB_303671
Mouse monoclonal anti-TSP1	Thermo Fisher Scientific	Cat#MA5-13390; RRID: AB_10979326
Mouse IgG1 Isotype Control	R&D Systems	Cat#MAB002; RRID: AB_357344
Goat IgG1 Isotype Control	R&D Systems	Cat#AB-108-C; RRID: AB_354267
Rabbit polyclonal anti-PU.1	Thermo Fisher Scientific	Cat#PA5-17505; RRID: AB_10989141
Goat polyclonal anti-Otx2	R&D Systems	Cat#AF1979; RRID: AB_2157172
Goat polyclonal anti-mouse Osteopontin	R&D Systems	Cat#AF808; RRID: AB_2194992
Goat polyclonal anti-human Osteopontin	R&D Systems	Cat#AF1433; RRID: AB_354791
Rabbit polyclonal anti-Iba1	Wako	Cat#019-19741; RRID: AB_839504
Rat monoclonal anti-CD102	BD Biosciences	Cat#553325; RRID: AB_394783
Biological Samples		
Peripheral blood from human donors	CHNO des Quinze-Vingts, Paris, France	N/A
Post-mortem RPE/choroid/sclera and retinal pieces from healthy and AMD donors	Minnesota Lions Eye Bank, USA	N/A
Healthy porcine eyes	Guy Harang slaughterhouse, Houdan, France	N/A
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Recombinant Human Thrombospondin-1 Protein	R&D Systems	Cat#3074-TH-050
Recombinant Human Thrombospondin-1 C-terminal domain (Cter) with a FLAG-epitope at the N terminus	GTP Technology, Labège, France	N/A
Recombinant Human HTRA1 Protein	R&D Systems	Cat#2916-SE-020
Control peptide (KRFYGGMWKK)	Genepep, France	N/A
4N1K CD47-activating peptide (KRFYVMWKK)	Genepep, France	N/A
Control bi- peptide Ac- KVRMKF YVWKGGGGGGGKVRMKF YVWK -NH ₂	Genepep, France	N/A
Bi4N1K peptide (with PEG spacer) Ac-KRFYVMWKK-PEG7-KRFYVMWKK-NH ₂ PEG7 = NH ₂ -(CH ₂ CH ₂ O) ₇ -CH ₂ CH ₂ COOH	Genepep, France	N/A
Bi4N1K peptide (with 8G spacer) Ac-KRFYVMWKKGGGGG GGGKRFYVMWKK-NH ₂	Genepep, France	N/A

(Continued on next page)

Continued		
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
HTRA1 inhibitor DPMFKLboroV	Roche Innovation Center, Basel, Swiss	www.roche.com
Critical Commercial Assays		
EasySep™ Mouse Monocyte Isolation Kit	STEMCELL Technologies	Cat#19861
EasySep™ Human Monocyte Enrichment Kit	STEMCELL Technologies	Cat#19059
Human HTRA1 Elisa	Elabscience	Cat#E-EL-H0423
Humain OPN Elisa	R&D Systems	Cat#DOST00
MILLIPEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panels	Millipore	Cat#HCYTOMAG
Experimental Models: Cell Lines		
COS-7 cell line	ATCC	Cat#CRL-1651, RRID: CVCL_0224
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: C57BL/6J (rd8 mutation free)	The Jackson Laboratory	RRID: IMSR_JAX:000664
Mouse: <i>Opn</i> ^{−/−} (rd8 mutation free)	The Jackson Laboratory	B6.129S6(Cg)-Spp1tm1Blh/J Stock No: 004936
Mouse: <i>Thbs1</i> ^{−/−} (rd8 mutation free)	The Jackson Laboratory	B6.129S2-Thbs1tm1Hyn/J Stock No: 006141
Oligonucleotides		
Taqman primers for HTRA1	Thermo Fisher Scientific	Cat#Hs01016151_m1
Taqman primers for ARMS2	Thermo Fisher Scientific	Cat#Hs01394203_m1
Primers for human ARMS2 ARMS2 forward 5c-TCGGTGGTT CCTGTGTCCTTCATT-3c, ARMS2 reverse 5c-TCACCTTGCTGCAG TGTGGATGA-3c	Integrated DNA Technologies, Inc	N/A
Primers for human OPNSPP1 forward 5c-GCACAGGTGATGC CTAGGAG-3c, SPP1 reverse 5c- ACCAGACTCGTCTCAGGAG-3c	Integrated DNA Technologies, Inc	N/A
Primers for human PLEKHA1 PLEKHA1 forward 5c-GCCCTGAA GAGATGCACAGT-3c, PLEKHA1 reverse 5c-AAGGGTTCGACAGCCTTCTG-3c	Integrated DNA Technologies, Inc	N/A
Primers for <i>Mus musculus Opn</i> <i>Spp1</i> forward 5c-TCTTCTGCGG CAGGCATT-3c <i>Spp1</i> reverse 5c-TGC CAATCTCATGGTCGT-3c	Integrated DNA Technologies, Inc	N/A
Recombinant DNA		
Plasmid: pCX_CD47-V5; human CD47 with a C-terminal V5 flag	This paper Genecust, Boynes, France	N/A
Plasmid: pCX_CD47-Myc; human CD47 with a C-terminal Myc flag	This paper Genecust, Boynes, France	N/A
Software and Algorithms		
ProteinScape 2.1	Bruker Daltonics	www.bruker.com
GraphPad Prism	GraphPad Software	www.graphpad.com/
Compute pI/Mw	Expasy	https://web.expasy.org/compute_pi/
Data Analysis 3.4	Bruker	www.bruker.com
Mascot Server 2.2.07	Matrix Science	www.matrixscience.com/
PEAKS Studio 8.5	Bioinformatics Solutions Inc.	www.bioinformatics.com
MetaMorph	Molecular Devices	www.moleculardevices.com
HCS iDev Cell Analysis Software	Thermo Fisher Scientific	Cat#SX000041A

(Continued on next page)



Continued		
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
RNA-seq Aligner v2.6.1c	STAR	https://github.com/alexdobin/STAR
FeatureCounts	GNU General Public License	http://subread.sourceforge.net/
edgeR	LGPL license	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html
Other		
Thermo HPLC UltiMate 3000 System	Thermo Scientific	Cat#UltiMate 3000
HCT Ultra Ion Trap	Bruker	www.bruker.com
ChemiDoc Imaging System	Biorad	Cat#1708265
Mass spectrometry data	PRoteomics IDEntifications Database (PRIDE)	http://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD020546

RESOURCE AVAILABILITY

Lead Contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Florian Sennlaub (florian.sennlaub@inserm.fr).

Materials availability and Data and Code Availability

This study did not generate new unique reagents. The peptide sequences of all peptides are indicated and can be produced by any peptide producing company. The study also did not make use of any unpublished custom code, software, or algorithm that is central to supporting the main claims of the paper.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Animals

Wildtype (C57BL/6J) mice, *Opn*^{-/-} and *Thbs1*^{-/-} mice were obtained from Charles River and the Jackson laboratories respectively. All mice used in this study were male of two- to three-months old, weighted approximately 25mg and were rd8 mutation free, as this mutation can lead to an AMD-like phenotype (Mattapallil et al., 2012). Male mice were used to eliminate the influence of the reproductive cycle on neovascularization. The mice were kept to the indicated ages under specific pathogen-free condition in a 12 h/12 h light/dark (100 lux) cycle with no additional cover in the cage and with water and normal chow diet available *ad libitum*. All experimental protocols and procedures were approved by the French Ministry of higher Education, Research and Innovation (laser-induced CNV model and intravitreal injections APAFIS#2218-2015090416008740, laser-induced CNV and light-challenge models on *Thbs1*^{-/-} mice APAFIS#19412-2019022215422220, subretinal adoptive transfer of monocytes N°APAFIS#20132-201904041225363 and laser-induced CNV on *Opn*^{-/-} mice N°APAFIS#22513-2019101817209742).

Primary cells

Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)

In accordance with the Declaration of Helsinki, all volunteers provided written and informed consent for the human monocyte expression studies, which was approved by the Direction Générale pour la Recherche et l'Innovation of the Ministère de l'Enseignement et de la Recherche (Dossier n°14.007) and by the Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (N°Ref.: IFP/MKE/AR144088).

Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) were isolated from subjects with previously documented 10q26 haplotype status, as they participated in the Parisian branch of an AMD-GWAS study (1129 participants, 107 mH/mH-carriers, 412 mH/cH-, and 610 cH/cH-carriers) (Fritsche et al., 2013). Eighteen mH/mH-study participants of the Parisian region positively answered to our invitation for an ophthalmological re-examination and a blood sampling. The group was composed of 9 control subjects (absence of large drusen and late AMD) and 9 patients with neovascular AMD. They were homozygous-risk-nucleotide-carriers of all the markers of the 10q26 AMD-associated haplotype block included in our GWAS analysis (rs10490924, rs3750846, rs3750847, rs3750848, rs11200638, rs3793917, rs1049331, rs2293870, rs2284665, and rs932275) that define the common 10q26 risk haplotype (Liao et al., 2017). None of the patients displayed one of the rare, incomplete haplotype blocks. A group of 18 age-, and sex-matched homozygous cH/cH- carriers composed of 9 control subjects and 9 wet AMD patients (Figure 1) was recruited in parallel. PBMCs from healthy cH/cH male donors from 25 to 50 years old were used served for all other experiments.

Briefly, human peripheral mononuclear cells from blood were obtained after a Ficoll (GE Healthcare) gradient centrifugation. CD14⁺ monocytes were isolated by negative selection using the EasySep Human Monocyte Enrichment Cocktail (StemCell Technologies) and cultivated in X-Vivo15 (Lonza) at 37°C and 5% CO₂.

Primary porcine RPE

Primary porcine RPE cells were isolated as previously described (Mathis et al., 2017). Porcine eyes were bought at a local slaughterhouse (Guy Harang, Houdan, France) in agreement with the local regulatory department and the slaughterhouse veterinarians. Porcine eyes were obtained 2 or 3 h after enucleation in CO₂-independent serum (Thermo Fisher Scientific). Eyes were cleaned for muscles and immersed few minutes in an antiseptic solution (Pursept-A Xpress, Merz Hygiene GmbH). Anterior segment of the bulb was removed, as well as lens, vitreous, and retina. Each eyecup was washed 2 times with PBS (Thermo Fisher Scientific) and incubated for 1 h at 37°C with 0.25% trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific). RPE cells were pipetted off the choroid and re-suspended in Dulbecco's modified Eagle's serum (DMEM, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 20% fetal calf serum (FCS, Thermo Fisher Scientific) and 1% antibiotics penicillin/streptomycin (PS). Purified cells were then seeded on a 60mm Petri dish in DMEM-FCS20%-PS1% and incubated with a controlled atmosphere at 5% CO₂ at 37°C. The culture medium was changed 24 h after the seeding. When cells were confluent, 0.05% trypsin-EDTA was added for 5 min at 37°C to detach the RPE cells. They were finally seeded on 96-well culture plate (Corning) at the concentration of 75 000 cells/well in DMEM-FCS20%-PS1%. Confluence state was obtained after 3 days in culture at 37°C, 5% of CO₂.

Mice bone marrow monocytes (BMM)

Mice bone marrow monocytes (BMM) were harvested from 2- to 3-month-old male C57BL/6, Thbs1^{-/-}, CD36^{-/-} or CD47^{-/-} mice killed by CO₂ inhalation. BMM were flushed from femurs and tibiae with PBS containing 5% fetal bovine serum. BMM were negatively selected by magnetic sorting following the protocol suggested by the manufacturer (EasySep Mouse Monocyte Enrichment Kit; StemCell Technologies, Inc.). Briefly, the mouse monocyte enrichment mixture is designed to enrich mouse monocytes from mouse bone marrow by depletion of T cells, B cells, NK cells, dendritic cells, progenitors, granulocytes, and red blood cells using a combination of biotinylated monoclonal antibodies directed against these cell-surface antigens. Unwanted cells were specifically labeled with dextran-coated magnetic particles using biotinylated antibodies against cell-surface antigens expressed on the unwanted cells. Magnetically labeled cells were then separated from unlabeled target cells by using a magnet. The purity of the BMM was assayed by flow cytometry using CD11b, LY6C, and LY6G markers. The CD11b+ LY6C+ LY6G- (BMM) cell content of the enriched cells ranges from 85 to 95%. The rest of the enriched cells were CD11b+ LY6G+ cells (neutrophils).

Human donor eyes

Human eyes were obtained from donors giving written consent from the Minnesota Lions Eye Bank. For this study, four control maculae from four subjects and four patients with known history of wet AMD and visible large drusen on dissection were used. Samples were immersed in a 4% paraformaldehyde solution and stored at -80°C.

METHOD DETAILS

Search for open chromatin and transcription factor binding sites

The Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) database was used to search for DNase I sensitive sites within the human genome; this database has results from more than 125 cell types, including primary cultures of RPE, T lymphocytes, and monocytes.

Human blood monocyte isolation and culture, RNA extraction, RT-PCR and Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Milliplex magnetic bead analysis

Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) were isolated from subjects described above. Briefly, human peripheral mononuclear cells from blood were obtained after a Ficoll (GE Healthcare) gradient centrifugation. CD14⁺ monocytes were isolated by negative selection using the EasySep Human Monocyte Enrichment Cocktail (StemCell Technologies). A part of the obtained purified monocytes were seeded in 48 well plates at 200 000 cells/well and cultivated for 24 h in X-Vivo15 (Lonza) at 37°C and 5% CO₂. HTRA1 and OPN concentrations were determined in the medium using HTRA1- (E-EL-H0423, Elabscience) and OPN- ELISA Kit (DOST00, R&D Systems). APOE, C3, α 2 microglobulin and CCL2 were determined using magnetic bead panels (Milliplex MAP, Millipore). Total RNA were isolated with Nucleospin RNAII (Macherey Nagel) from the remaining isolated monocytes and the Ficoll gradient containing the lymphocyte fraction. Single-strand cDNA was synthesized with 1 μ g of RNA pretreated with DNase amplification grade, using oligo-dT as primer and superscript II reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific). For real-time PCR, 1/100 of cDNA was incubated with the polymerase and the appropriate amounts of nucleotides (TaqMan Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems; Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems). qPCR were realized with the StepOne Plus real-time PCR system (Applied Biosystems) using the following parameters: 45 cycles of 15 s at 95°C, 45 s at 60°C. Results were normalized with expression of six housekeeping genes: GAPDH, RPS26, HPRT1, G6PDH, ACTB and RPL37A.

In a separate set of experiments, purified monocytes from healthy male cH/cH donors were seeded in 96 well plates at 150 000 cells/well and cultivated for the indicated times in X-Vivo15 (Lonza) at 37°C and 5% CO₂. They were incubated in the different experiments as indicated with PBS (control), 80nM of recombinant TSP1 (Carrier Free, 3074-TH-050, R&D), 5 μ g/mL of recombinant HTRA1 (Carrier Free, 2916-SE-020, R&D), rTSP1 with rHTRA1, rHTRA1 with 2.5 μ M of the bi4N1K peptide or rHTRA1 with 2.5 μ M



of the control bi-peptide (see co-culture treatments), or the HTRA1 inhibitor DPMFKLboroV (Roche). RNA was extracted at 3, 6, h for real-time PCR analysis (normalized with GAPDH and RPS26) and supernatants of 24 h and 72 h culture were collected for OPN ELISA quantifications.

Gene expression analysis

For whole transcriptome analysis, healthy volunteer CD14⁺ monocytes were prepared as described above, seeded in 24 well plate at 500 000 cells/well in X-Vivo15 medium and stimulated for 6 h with PBS, recombinant HTRA1 (5 µg/mL; R&D) or rHTRA1 and bi4N1K peptide (2.5 µM). After cell lysis, RNA was extracted using the QIAGEN RNA Mini Kit with RNase (ribonuclease)-free DNase (deoxy-ribonuclease) I digestion. RNA quality and quantity were evaluated using BioAnalyzer 2100 with the RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies). RNA sequencing libraries were constructed from 1 µg of total RNA using a modified TruSeq RNA Sample preparation kit protocol. Pass-filtered reads were mapped using STAR v2.6.1c and aligned to human reference genome GRCh38.92 (Dobin et al., 2013). The count table of the gene features was obtained using FeatureCounts (Liao et al., 2014). Normalization, differential expression analysis and TPM (transcript per million) values were computed using EdgeR (Liao et al., 2014). Protein coding mRNAs with greater than 25 in the HTRA1-group and a false discovery rate < 0,01 were selected.

Donor eyes and immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on RPE/choroid/sclera and retinal pieces from healthy and AMD donors described above. Samples were immersed in a 4% paraformaldehyde solution and stored at -80°C. Tissues were thawed at room temperature, rinsed with PBS and post-fixed 5 min in ice cold acetone 100% solution. Samples were then treated with primary antibodies: anti-HTRA1 antibody (1:100, ab38611, Abcam) and anti-IBA1 antibody (1:100, ab5076, Abcam) in PBS containing 0.1% Triton X-100 for one day at room temperature with gentle rocking. After few washes in PBS, samples were incubated for 5 h at room temperature with appropriate Alexa Fluor® conjugated secondary antibodies (1:500) in 0.1% Triton solution and were counterstained with Hoechst (1:1000, 33258, Thermo Fisher Scientific). Preparations were rinsed, mounted on glass slides with Fluoromount aqueous mounting medium (Sigma-Aldrich). Acquisitions were made with an Olympus FV1000 (Olympus, Rungis, France) confocal microscope.

Synthesis of recombinant TSP1 Cter domain (rCter)

We designed a protein encompassing human TSP1 C-terminal sequence from Asp834 until Pro1169 fused to a HAVT20 leader peptide amino acid sequence followed by a Flag tag at the N terminus of the TSP1 C-terminal domain (Figure S2D). The recombinant protein was produced and purified in human embryonic kidney cells by GTP Technology (Labège, France).

In vitro digestion of recombinant TSP1 and its Cterminal domain by HTRA1

HTRA1-digested recombinant TSP1 and Cter domain was prepared by mixing 1,5 µg of recombinant human TSP1 (Carrier Free, 3074-TH-050, R&D; rCter see above) with 50 to 880 ng of recombinant human HTRA1 (Carrier Free, 2916-SE-020, R&D) in 50 µL of digestion buffer (50mM Tris HCl pH8.0; 150mM NaCl_i) for 12 h at 37°C. For controls, TSP1 (1,5 µg), rCter (1,5 µg) or HTRA1 (880ng) were incubated alone in the same conditions.

Silver nitrate staining and western blot fragment analysis

Samples were diluted in 4X Laemmli buffer and heated at 95°C for 5-10 min before loading on the NuPAGE 4%-12% Bis-Tris gel. Each gel was loaded with PageRuler Prestained protein ladder (Thermo Fisher Scientific). Gels were either processed for silver nitrate staining or transferred to nitrocellulose membranes (0,2 µm, GE Healthcare) by BioRad blotting system for Western Blotting according to manufacturer's protocol. Immunoblots were blocked with 5% skimmed milk powder in TBS 1X 0,2% Tween, then probed with the following antibodies at a 1:500 dilution in the same buffer: Goat anti-Thrombospondin N-ter (ab111230, Abcam), Mouse anti-FLAG® M2 (F3165, Sigma Aldrich). Secondary antibodies, donkey anti-goat HRP (705-035-003, Jackson ImmunoResearch), Horse anti-mouse HRP (PI2000, Vector Laboratories), were applied at a dilution of 1/5 000 in blocking buffer. Chemoluminescence was performed using Pierce ECL-plus (32132, Thermo Fisher Scientific) and the ChemiDoc Imaging System (Biorad). Putative molecular mass of the fragments resulting from HTRA1 digestion was calculated using the ExPASy Compute pI/Mw bioinformatics tool.

Mass spectrometry

Tryptic digestion

Proteins were submitted to reduction by incubation with 5 mM dithiotreitol in 50 mM ammonium bicarbonate (AmBic) for 30 min at 37°C, then alkylation with 15 mM iodoacetamide in 50 mM AmBic for 30 min, RT. Tryptic digestion was performed with a protein/enzyme ratio of 25/1 at 37°C overnight in 50 mM AmBic.

Mass spectrometry analysis

Two replicates of *in vitro* digestion of TSP1 (1,5 µg) by HTRA1 (880ng) and TSP1 alone conditions were processed by LC-MS/MS. The second replicate was processed twice for LC-MS/MS. Peptide mixtures were supplemented with formic acid to a final concentration of 0.1% and analyzed on a U3000 nanoLC (Thermo) coupled to an HCTultra ion trap (Bruker). Peptides were concentrated and desalted for 5 min on a precolumn RP-C18 (5 mm, 300 µm i.d., 100 Å, Thermo) with a mobile phase A (2% ACN/0.1% formic acid) at a flow rate of 20 µL/min then separated on an analytical column RP-C18 (15 cm, 75 µm i.d., 100 Å, Dionex) at a flow rate of 300 nL/min. Elution gradient was run from 2% to 10% of solvent B (95% ACN/0.1% formic acid) in 10 min then 10% to 35% B in 60 min and 35%

to 50% B in 10 min. The ion trap was used in the positive mode with the selection of 8 precursors from each MS spectrum for fragmentation by collision induced dissociation (CID). Capillary voltage was set at 2 kV, Full scan spectra were acquired in the mass range 250 to 1600 m/z and MS/MS spectra were acquired from 100 to 2800 m/z with singly charged ions exclusion, a dynamic exclusion of 30 s and an isolation width of 4 Da. ICC smart target was set to 250'000 and the target mass to 622 m/z.

Protein identification

Raw data obtained by LC-MS/MS were processed using Data Analysis 3.4 (Bruker). Mgf files were generated with a maximum of 5000 compounds with a signal intensity threshold of 100'000 (AU) and spectra deconvolution. Protein identification was performed with ProteinScape 2.1 (Bruker) using Mascot 2.2.07 with SwissProt database (01/04/15), *Homo sapiens* taxonomy (20203 entries). Trypsin was selected as the enzyme with 2 missed cleavages. Carbamidomethylation of Cys was set as a fixed modification and oxidation of Met as variable modifications; MS tolerance and MS/MS tolerance were set at 0.5 Da. A p value < 0.05 was required for peptide validation (Table S2). In addition, analyses were performed using semi-trypsin as the enzyme using the same parameters (Table S1). LC-MS/MS data were also processed with the search engine PEAKS (PEAKS Studio 8.5) with the same parameters extended to 3 missed cleavages and acetylation (N-ter) as a variable modification. Semi-trypsin peptides were considered real if identified by both search engines (Mascot with a p value < 0.05 and PEAKS with an FDR < 1%) in all HTRA1-digested TSP1 experiments (2 replicates and the 2nd MS processing) and absent from the TSP1 alone condition. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository (Perez-Riverol et al., 2019) with the dataset identifier PXD020546

CD47V5 CD47Myc proximity ligation assay

COS-7 cells, plated into a 24-well plate coated with Poly-L-Lysine, were mono- and co-transfected with plasmids coding for human CD47 with a C-terminal V5 or Myc flag using Lipofectamine 2000 reagent (Life). After 48 h of transfection, mono- (immunohistochemistry) and co-transfected cells (immunohistochemistry and proximity ligation assay; PLA) were rinsed with PBS, fixed 10 min in 4% paraformaldehyde solution, rinsed, permeabilized and blocked by incubating cells 10 minutes in 0.2% gelatin in PBS containing 0.25% Triton X-100 (PBS-GT). Cells were incubated overnight with mouse monoclonal anti-V5 Tag (Invitrogen, R960-25; 1/2000) and rabbit polyclonal anti-myc Tag (Abcam, ab9106; 1/2000) antibodies at 4°C under gentle agitation in the same solution. For immunohistochemistry, mono- and co-transfected cells were then incubated with donkey anti-rabbit-Alexa 488, anti-mouse-Alexa-594 secondary antibodies, and Hoechst (Thermo Fisher Scientific) 2 h at room temperature. For Duolink® PLA assays anti-rabbit and anti-mouse oligonucleotides-labeled secondary antibodies (PLA probes) were incubated, followed by a ligase and polymerase reaction following manufacturer's instructions to amplify the signal. For the PLA experiments cells were starved for 2 h and incubated 5 min with DMEM, recombinant TSP1 (R&D Systems) in DMEM 10 µg/mL, or HTRA1-digested TSP1 in DMEM (10 µg/mL previously incubated 16 h with HTRA1) prior to fixation. Images were taken on an Olympus FLUOVIEW FV1000 confocal laser-scanning microscope or a fluorescence microscope (DM5500, Leica) to quantify the PLA fluorescence intensity per cell using MetaMorph (Molecular Devices).

RPE Monocyte Co-culture (Mathis et al., 2017)

Porcine RPE cells and mouse bone marrow monocytes (BMM) were obtained as described above. The day before experiment, RPE cells were serum-starved. A total of 100 000 freshly purified human monocytes from a healthy donor purified as described above, or 50 000 mouse BMM were added to confluent RPE cells in High-Glucose DMEM- 1% Penicillin and Streptomycin. Cells were incubated with human recombinant HTRA1 (5 µg/mL, R&D Systems), a control peptide (KRFYGGMWKK), the 4N1K CD47-activating peptide (KRFYVVMWKK), double peptides where two 4N1K were linked by a 8 glycine spacer or a (CH₂CH₂O)₇ polyethylene glycol spacer, a control bi-peptide (KVRMKFYVWKGGGGGGKVRMKFYVWK) (Genepep), human recombinant TSP1 (80 nM, R&D Systems) or blocking antibodies: a CD36 blocking antibody (10 µg/mL, Ab17044, Abcam), a CD47 blocking antibody (10 µg/mL, Ab3283, Abcam), a TSP1 blocking antibody (5 µg/mL, MA5-13390, Thermo Fisher Scientific), function blocking anti-human OPN (10 µg/mL, AF1433, R&D), and a mouse anti-IgG isotype control (5 µg/mL, MAB002, R&D Systems). Co-cultures were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 48 h. At the end of co-culture, cells were washed with PBS and fixed in a 4% paraformaldehyde solution for 10 min. Fixed cells were washed twice in PBS and incubated for 2 min in a permeabilization solution (freshly prepared 0.1% triton and 0.1% sodium citrate in PBS). Cells were blocked for 1 h in PBS and triton 0.1% containing 5% horse serum (Thermo Fisher Scientific) and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies: polyclonal rabbit anti-human PU.1 (1:200, PA5-17505, Thermo Fisher Scientific) and polyclonal goat anti-human OTX2 (1:500, AF1979, R&D Systems) diluted in PBS triton 0.1% and 1% horse serum. Washed cells were then incubated for 1 h at room temperature with appropriate Alexa Fluor® conjugated secondary antibodies (1:500) in 0.1% Triton solution and were counterstained with Hoechst (1:1000, 33258, Thermo Fisher Scientific). The cells were washed and acquisitions were made with a fluorescent microscope (Arrayscan VTI HCS Reader, Thermo Fisher Scientific). Twenty-five fields per well were analyzed and recorded by Arrayscan software (HCS iDev Cell Analysis Software, Thermo Fisher Scientific). Results are percentage of the number of PU.1 or OTX2 positive cells and normalized with the HTRA1 treated condition.

QPCR on bone marrow-derived Monocyte (BMM) mono-culture

50 000 mice BMM were seeded on 96-well plate in High-Glucose DMEM 1% Penicillin and Streptomycin. After 18 h incubation, total RNA was prepared with NucleoSpin RNA Plus XS (Macherey-Nagel) and cDNA was synthesized with QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN). For real time PCR, 1/100 of cDNA was used per reaction using PowerSYBR green PCR mix and StepOne Plus



apparatus and software (Applied Biosystems). *SPP1* gene (Opn) to S26 ratios were determined from three independent assays by the 2–DCT method. PCR conditions: PCR cycles: 15 s at 95°C, 30 s at 60°C, 30 s at 72°C.

Subretinal adoptive mononuclear phagocyte transfer and clearance (Calippe et al., 2017; Levy et al., 2015)

BMMs were sorted as described above, labeled in 10 μ M CFSE (Thermo Fisher Scientific), washed and resuspended in PBS. 12000 cells (in 4 μ L) were injected in the subretinal space of anesthetized WT male mice (10–14 weeks old) using glass microcapillaries (Eppendorf) and a microinjector as previously described (Levy et al., 2015). A hole was pierced with the glass capillary prior to the injection in order to avoid intra-ocular pressure increase and to allow retinal detachment with 4 μ L of solution. The subretinal injection was verified by fundoscopy. In specific experiments, the cells were co-injected with recombinant human TSP1 (10 mg/mL), recombinant human HTRA1 (100 μ g/mL), or both, the control bi peptide, or the bi-4N1K CD47-activating peptide (150 μ M), control IgG or function blocking anti-mouse OPN (10 μ g/mL). Eyes were enucleated after 24 h, fixed 30 min in PFA 4% and counterstained with Hoechst nuclear stain. Eyes with hemorrhages were discarded. CFSE+ cells in the subretinal space were quantified on flatmounts on the RPE side of the retina and on the apical side of the RPE.

In vivo laser-injury (Lavalette et al., 2011) and light-challenge experiments (Hu et al., 2015; Levy et al., 2015)

Laser-coagulations were performed on male mice (Vitra Laser, 532 nm, 450 mW, 50 ms, and 250 mm), which were intravitreally injected (days 4 and 7) using glass capillaries (Eppendorf) and a microinjector, with 1 μ L of PBS, recombinant human TSP1 (10 mg/mL), recombinant human HTRA1 (100 μ g/mL), or both, the control IgG or function blocking anti-mouse OPN (10 μ g/mL) and sacrificed at day 10.

For the light-challenge model, two- to three-months old male *Thbs1*^{−/−}-mice were adapted to darkness for 6 h, pupils dilated daily and exposed to green LED light (starting at 2AM, 4500 Lux, JP Vezon Equipements) for 4 days, injected subretinally (as for adoptive transfer experiments) with 4 μ L of the indicated solutions of PBS, recombinant human TSP1 (10 mg/mL), recombinant human HTRA1 (100 μ g/mL), or both, the control bi peptide, or the 4N1K CD47-activating peptide (150 μ M), control IgG or function blocking anti-mouse OPN (10 μ g/mL) and subsequently kept for 2 days in cyclic 12 h/12 h normal facility conditions as previously described (Sennlaub et al., 2013).

After fixation in a 4% paraformaldehyde solution, the retinas and choroids were incubated with anti-IBA-1 (1:400, 019-19741, Wako) and anti-CD102 (for laser-experiments only; 1:200, 553325, BD PharMingen) in PBS containing 0.1% Triton X-100 for 12 h at room temperature with gentle rocking. After few washes in PBS, samples were incubated for 2 h at room temperature with appropriate Alexa Fluor® conjugated secondary antibodies (1:500) in PBS solution and were counterstained with Hoechst (1:1000, 33258, Thermo Fisher Scientific). Preparations were rinsed, mounted on glass slides with Fluoromount aqueous mounting medium (Sigma-Aldrich). Preparations were observed under a fluorescence microscope (DM5500, Leica) and the surface covered by CD102+CNV was measured on photographs and the average CNV size was calculated; IBA-1+ MPs on the RPE were counted in a diameter of 500 μ m around the CD102+ neovascularizations; IBA-1+ cells were counted on whole RPE/choroidal flat-mounts and on the outer segment side of the retina for the light-challenge model.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Gene expression analysis

Pass-filtered reads of whole transcriptome were mapped using STAR v2.6.1c and aligned to human reference genome GRCh38.92 (Dobin et al., 2013). The count table of the gene features was obtained using FeatureCounts (Liao et al., 2014). Normalization, differential expression analysis and TPM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped) values were computed using EdgeR (Liao et al., 2014). Protein coding mRNAs with greater than 10 TPMs in the HTRA1 group and an false discovery rate < 0.01 were selected.

Analyze of the CD47V5 CD47Myc proximity ligation assay

Images were taken on an Olympus FLUOVIEW FV1000 confocal laser-scanning microscope or a fluorescence microscope (DM5500, Leica) to quantify the PLA fluorescence intensity per cell using MetaMorph (Molecular Devices).

Quantification of RPE/Monocyte Co-culture

Acquisitions were made with a fluorescent microscope (Arrayscan VTI HCS Reader, Thermo Fisher Scientific). Twenty-five fields per well were analyzed and recorded by Arrayscan software (HCS iDev Cell Analysis Software, Thermo Fisher Scientific). Results are expressed as percentages of the number of PU.1 or OTX2 positive cells and normalized with the HTRA1 treated condition.

Quantification in laser-injury and light-challenge model

The surface covered by CD102+CNV was measured on photographs and the average CNV size was calculated; IBA-1+ MPs on the RPE were counted in a diameter of 500 μ m around the CD102+ neovascularizations; IBA-1+ cells were counted on whole RPE/choroidal flat-mounts and on the outer segment side of the retina for the light-challenge model.



Statistical analysis

GraphPad Prism8 (GraphPad Software) was used for data analysis and graphic representation. All values are reported as mean $\pm$ SEM. Experiments were analyzed with the nonparametric Student t test and/or Mann–Whitney U-test, as indicated in the legends. $p < 0.05$ was considered statistically significant. The n and P values are indicated in the figures and the figure legends.

Thibaud MATHIS : Maladie de Parkinson et DMLA : Y a-t-il un lien ?

XX pages, XX illustrations, 4 tableaux

RESUME

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) néovasculaire est l'une des causes majeures de perte de vision, malgré une thérapie répétée par injections intravitréenne d'anti-VEGF qui constitue un fardeau considérable pour les patients, les ophtalmologistes et le système de santé. Une étude de cohorte rétrospective sur plusieurs millions de patients aux États-Unis a retrouvé que les patients parkinsoniens, traités par la L-DOPA avaient un âge de diagnostic de DMLA néovasculaire significativement plus tardif que les patients non traités. Grâce à l'utilisation d'un modèle murin de Parkinson par intoxication au MPTP, et d'un modèle murin de DMLA néovasculaire induite par phototraumatisme laser, en association avec le traitement standard de la maladie de Parkinson, nous avons montré qu'un traitement par L-DOPA induit une augmentation de la signalisation du récepteur à la dopamine D2, responsable d'une inhibition de la néovascularisation choroïdienne. Ces résultats apportent une explication à une épidémiologique intrigante. Poursuivant les travaux sur les récepteurs de la dopamine dans nos modèles murins, nous avons montré que des agonistes systémiques du récepteur D2 provoquaient une diminution de la néovascularisation. Ce comportement pourrait constituer une thérapie efficace pour réduire le besoin d'injections d'anti-VEGF chez les patients atteints de DMLA néovasculaire.

MOTS CLES :

Angiogenèse ; dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) ; dopamine ; epithelium pigmentaire rétinien ; L-DOPA ; maladie de Parkinson ; monocytes ; néovascularisation choroïdienne

JURY :

Pr. Gilles RODE	Université Lyon 1	Président
Pr. Stéphanie BAILLIF	Université Nice	Rapporteur
Pr. Isabelle MEUNIER	Université Montpellier	Rapporteur
Pr Catherine CREUZOT-GARCHER	Université Bourgogne	Examinatrice
Pr. Przemyslaw SAPIEHA	Université Montréal	Examineur
Pr. Laurent KODJIKIAN	Université Lyon 1	Co-directeur
Dr. Florian SENNLAUB	Université Paris	Co-directeur

DATE DE SOUTENANCE : 11 décembre 2020

Adresse de l'auteur : thibaud.mathis@chu-lyon.fr