



HAL
open science

Mécanismes de mort cellulaire dans le décollement de rétine : vers des thérapies neuroprotectrices

Alejandra Daruich

► **To cite this version:**

Alejandra Daruich. Mécanismes de mort cellulaire dans le décollement de rétine : vers des thérapies neuroprotectrices. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019UNIP5066 . tel-03881716

HAL Id: tel-03881716

<https://theses.hal.science/tel-03881716>

Submitted on 2 Dec 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.



UNIVERSITÉ
PARIS
DESCARTES



Université de Paris

Université de Paris

École doctorale Médicament-Toxicologie-Chimie-Imageries
(MTCI ED 563)

*Laboratoire INSERM, UMRS 1138, Équipe 17, Physiopathologie des maladies
oculaires: innovations thérapeutiques*

Mécanismes de mort cellulaire dans le décollement de rétine : vers des thérapies neuroprotectrices

Par Alejandra Daruich

Thèse de doctorat de pharmacologie

Dirigée par Francine Behar-Cohen

Présentée et soutenue publiquement le 11 décembre 2019

Devant un jury composé de :

Catherine Cruzot, PU-PH, Université de Dijon. Rapporteur

Marie-Noëlle Delyfer, PU-PH, Université de Bordeaux. Rapporteur

Jeffrey Boatright, Professor, Emory University, Atlanta. Examineur

Amélie Bochot, PU, Université Paris Sud. Examineur

Dominique Bremond-Gignac, PU-PH, Université Paris Descartes. Examineur

Christophe Chiquet, PU-PH, Université de Grenoble Alpes. Examineur



Except where otherwise noted, this is work licensed under
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

[A Sofia, Amalia et Alexandre]

Remerciements

Au Professeur Francine Behar-Cohen,

Je vous remercie de m'avoir fait découvrir l'univers de la recherche, pour vos encouragements et votre rigueur pendant la direction de cette thèse, pour votre soutien et vos conseils, soyez assurée de ma profonde admiration et reconnaissance.

Aux Professeurs Marie-Noëlle Delyfer, Catherine Creuzot, Amélie Bochot et Christophe Chiquet,

Je vous remercie pour l'honneur que vous me faites de juger ce travail.

Au Professeur Dominique Bremond-Gignac,

Je vous exprime ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de votre service, pour votre soutien et votre confiance au quotidien, et pour me faire l'honneur de juger ce travail.

Au Professeur Jeffrey Boatright,

I am very grateful of our collaboration, always generous and in a good mood. I hope it will be the first of many others. Thank you for taking part of the thesis jury.

Au Docteur Emilie Picard,

Je te remercie vivement pour ton aide et ton encouragement au quotidien tout au long de ces années. Les enseignements que tu m'a généreusement transmis ont été indispensables à l'accomplissement de ce travail et je te suis très reconnaissante.

A mes collègues de l'équipe 17,

Thara Jaworski, Kimberley Delaunay, Jenny Youale, Léa Parenti, Cecilia Vitali, Quentin Le Rouzic, Marie-Christine Naud, Julia Pardo et au Dr Marianne Berdugo,

Je vous exprime mes sincères remerciements pour votre disponibilité au quotidien et votre aide précieuse au cours des expériences. Merci de votre compétence et votre bonne humeur.

Au Docteurs Patricia Lassiaz, Alicia Torriglia, Min Zhao et Marc Abitbol,

Je vous remercie pour vos conseils et nos discussions fructueuses essentiels pour l'avancement des expériences.

Au Docteur Hugues Henry,

Pour sa compétence unique dans la réalisation des mesures des acides biliaires dans les liquides oculaires.

A mes collègues du centre d'investigations cliniques, du laboratoire et du bloc opératoire de l'hôpital ophtalmique Jules-Gonin,

Je vous remercie pour votre aide à la réalisation de l'étude clinique incluse dans ce travail, notamment dans la réalisation de l'imagerie rétinienne et la manipulation et stockage des prélèvements chirurgicaux.

A mes collègues du Service d'Ophtalmologie de l'Hôpital Necker-Enfants Malades,

Merci pour votre aide et votre soutien.

A ma famille et ma belle-famille,

Je vous remercie pour votre soutien et affection, sans lesquels rien ne serait possible.

Résumé

Le décollement de rétine (DR) est la séparation de la rétine neurosensorielle de l'épithélium pigmentaire rétinien. Il se caractérise par une accumulation de liquide sous-rétinien (LSR) et une mort des photorécepteurs dès la 12^{ème} heure qui conduit à une altération irréversible de la vision. La chirurgie vitréo-rétinienne moderne permet la ré-application anatomique de la rétine dans la plupart des cas. Cependant, la récupération visuelle est limitée, et la moitié des patients auront une acuité visuelle inférieure à 4/10 malgré un succès anatomique. La protection des photorécepteurs est donc essentielle pour améliorer la récupération fonctionnelle après DR, justifiant l'identification de thérapies neuroprotectrices adjuvantes à la chirurgie. De plus, le DR constitue un véritable modèle de dégénérescence rapide des photorécepteurs bien corrélé à la pathologie chez l'homme, et impliquant de nombreux mécanismes de mort cellulaire. Le décollement de rétine peut donc être considéré comme une maladie « modèle » pour tester rapidement des molécules neuroprotectrices, utilisables dans des maladies rétinienne lentement dégénératives.

Des travaux antérieurs, issus du laboratoire et d'autres équipes, ont démontré que l'excès de fer contribue à la mort des photorécepteurs dans plusieurs maladies dégénératives de la rétine. Nous avons donc évalué dans un premier temps, le fer en tant que cible thérapeutique dans le DR. Nous avons montré que la concentration en fer et le pourcentage de saturation en fer de la transferrine, protéine endogène capable de transporter le fer en excès, sont plus élevés dans le vitré de patients atteints de DR que de patients témoins. Une plus haute concentration en fer était corrélée à une moins bonne récupération visuelle postopératoire. Dans des modèles murins de DR *ex vivo et in vivo*, où le fer induisait une nécrose immédiate et une apoptose retardée, la transferrine protégeait contre les deux types de mort cellulaire. Par séquençage

d'acide ribonucléique (ARN), les voies impliquées dans les effets neuroprotecteurs de la transferrine, au-delà de ses propriétés comme chélateur du fer, ont été identifiées.

Dans un deuxième temps, nous avons exploré la biodisponibilité oculaire chez des patients atteints de DR et les propriétés neuroprotectrices chez l'animal d'une autre molécule candidate, l'acide ursodésoxycholique (UDCA), un acide biliaire commercialisé pour le traitement de la cholestase hépatique. L'acide tauro-ursodésoxycholique (TUDCA), le conjugué taurinique d'UDCA, a montré des effets neuroprotecteurs dans un modèle de DR *in vivo*. Cependant, à la différence d'UDCA, TUDCA n'est pas commercialisé sous une forme galénique approuvée, retardant son évaluation clinique. Nous avons observé qu'UDCA administré oralement en préopératoire chez des patients atteints de DR, traversait la barrière hémato-rétinienne d'autant plus que le décollement était étendu et la rupture de la barrière, mesurée par la concentration d'albumine dans le LSR, importante. Des concentrations plus élevées d'UDCA dans les liquides oculaires des patients étaient corrélées à une meilleure récupération visuelle postopératoire. UDCA, aux concentrations retrouvées dans les liquides oculaires de patients, diminuait l'apoptose et la nécrose dans trois modèles *ex vivo* de DR chez le rat. Une analyse transcriptomique a montré qu'UDCA régulait positivement de gènes impliqués dans l'apoptose, la réponse inflammatoire, la neurorégénération et la protection contre le stress oxydatif.

En conclusion, en utilisant une stratégie de recherche translationnelle, nous avons identifié deux voies thérapeutiques adjuvantes potentielles à la chirurgie du DR, dont les propriétés neuroprotectrices ouvrent des perspectives pour d'autres maladies dégénératives de la rétine.

Abstract

Retinal detachment (RD) is the separation of the neurosensory retina from the retinal pigment epithelium by subretinal fluid (SFR) accumulation. Photoreceptor cell death begins as early as 12 hours, which leads to irreversible visual impairment. Vitreoretinal surgery allows the anatomical reapplication of the retina in most cases. However, visual recovery is partial and 50% of patients recover less than 20/50 visual acuity. A neuroprotective therapy, adjuvant to surgery, and targeting photoreceptor cells death is therefore critical to improve visual outcome after RD. In addition, experimental RD is a model of rapid photoreceptor degeneration that correlates well with human pathology and involves several mechanisms of cell death allowing the study of neuroprotective strategies.

Since previous works demonstrated that retinal iron overload exacerbates cell death in various degenerative retinal diseases, we first assessed iron as therapeutic target in RD. In the vitreous from patients with RD, iron level and saturation of transferrin (an endogenous transporter of iron) were increased compared to controls. Higher iron concentrations was correlated with poorer postoperative visual recovery. In murine *ex vivo* and *in vivo* RD models, where iron induced immediate necrosis and delayed apoptosis, transferrin protected against both types of cell death. Using Ribonucleic acid (RNA) sequencing, pathways mediating the neuroprotective effects of transferrin were identified.

Secondly, we explored the ocular bioavailability in patients, and the neuroprotective properties in animals, of Ursodeoxycholic acid (UDCA), a bile acid approved for the treatment of hepatic cholestasis. Tauro-ursodeoxycholic acid (TUDCA), the taurine conjugate of UDCA, has previously shown neuroprotective effects in an *in vivo* model of RD. However, unlike UDCA, it is not commercialized as drug formulation, delaying its clinical evaluation. We observed that

UDCA administered orally in patients with RD can cross the blood-retinal barrier according to the extension of its rupture. Higher concentrations of UDCA in SRF of RD patients were correlated with better visual recovery. At the concentration ranges measured in ocular fluids from patients, UDCA decreased apoptosis and necrosis in three *ex vivo* RD rat models. RNA sequencing analysis showed that UDCA up-regulated genes involved in apoptosis, inflammatory response, neuroregeneration and protection against oxidative stress.

In conclusion, using a translational strategy, we targeted two potential therapies adjuvants to surgery in RD, which also opens perspectives for other degenerative retinal diseases.

Liste des principales abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

AIF : apoptosis-inducing factor

AIP : inhibitor of apoptosis

Apaf-1 : apoptotic protease activating factor-1

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATG : autophagie

ATP : adénosine triphosphate

Bax : Bcl-2-associated X protein

Bcl-2 : B cell lymphoma 2

CHOP : CPEBP homologous protein

DISC : death inducing signaling complex

DMLA : Dégénérescence maculaire liée à l'âge

DMT1 : Divalent Metal Transporter 1

DR : décollement de rétine

EPR : épithélium pigmentaire de la rétine

FADD : Fas-associated death domain

GADD153 : growth arrest DNA damage-inducible gene 153

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

GRP78 : glucose-regulated protein 78

HIF : hypoxia inducible factor

HRE : hypoxia-responsive element

HO-1 : hème oxygénase 1

Igfbp3 : Insulin-like growth factor binding protein 3

IL : interleukine

IRE : iron-responsive elements

IRP : Iron-regulatory proteins

LC3 : light chain 3

LDH: lactate deshydrogénase

LIP : pool de fer labile

LSR : liquide sous-rétinien

MCP-1: monocyte chemoattractant protein 1

MIF : macrophage migration inhibitory factor

MLKL : mixed lineage kinase domain-like protein

MMP : matrix metalloproteinases

MOMP : perméabilisation de la membrane mitochondriale externe

NTBI : fer non liée à la transferrine

PCR : réaction en chaîne par polymérase

PGAM5 : phosphoglycerate mutase 5

PIDD : p53- induced death domain protein

PTPC : permeability transition pore complex

RIP : receptor-interacting protein

ROS: reactive oxygen species (espèces réactives d'oxygène)

SD-OCT: spectral domain optical coherence tomography (tomographie par cohérence optique)

Smac : second mitochondria-derived activator of caspases

SNC : système nerveux central

S1PR2 : sphingosine 1-phosphate receptor 2

TG : transgénique

TNF- α : tumor necrosis factor alpha

TRADD : TNF receptor-associate death domain

TRAF2 : TNF receptor-associated factor

RTF1: transferrin receptor 1

TSAT : pourcentage de saturation de la transferrine

TUDCA : acide tauro-ursodésoxycholique

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

UDCA : acide ursodésoxycholique

XIAP : X-Linked Inhibitor of Apoptosis

WB : western blotting

WT : wild-type (sauvage)

Sommaire

REMERCIEMENTS	1
RESUME.....	3
ABSTRACT.....	5
LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS	7
SOMMAIRE.....	10
1 INTRODUCTION	12
1.1 ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA RETINE	12
1.1.1 ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE L'ŒIL	12
1.1.2 ANATOMIE MACROSCOPIQUE DE LA RETINE	14
1.1.3 ANATOMIE MICROSCOPIQUE DE LA RETINE	16
1.1.4 PHYSIOLOGIE DE LA RETINE	19
1.1.4.1 La rétine neurosensorielle	19
1.1.4.2 L'épithélium pigmentaire de la rétine.....	22
1.1.4.3 Les barrières hémato-oculaires	24
1.2 LE DECOLLEMENT DE RETINE	27
1.2.1 ASPECTS CLINIQUES	27
1.2.1.1 Définition.....	27
1.2.1.2 Le Décollement de rétine rhéomatogène.....	28
1.2.1.3 Les décollements de rétine tractionnels et exsudatifs.....	31
1.2.2 LES MECANISMES DE MORT CELLULAIRE DANS LE DECOLLEMENT DE RETINE.....	31
1.2.2.1 Apoptose	32
1.2.2.2 RIP kinase et nécroptose	36
1.2.2.3 Perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP) et mort cellulaire.....	38
1.2.2.4 Famille Atg et autophagie.....	39
1.2.2.5 Inflammation et mort cellulaire.....	40
1.2.2.6 Stress du réticulum endoplasmique et mort cellulaire.....	41
1.2.3 NEUROPROTECTION ET DECOLLEMENT DE RETINE	42
1.2.3.1 Neuroprotection : définition	42
1.2.3.2 Intérêt de la neuroprotection dans le décollement de rétine.....	43
1.2.3.3 Thérapies neuroprotectrices dans des modèles animaux de décollement de rétine.....	43
1.3 LES MOLECULES NEUROPROTECTRICES ETUDIEES.....	47
1.3.1 LA TRANSFERRINE : STRUCTURE, FONCTION ET ROLE NEUROPROTECTEUR.....	47
1.3.1.1 Le rôle du fer.....	47
1.3.1.2 Homéostasie du fer	49
1.3.1.3 L'excès de fer, le stress oxydant et les maladies rétinienne.....	54
1.3.1.4 Les chélateurs du fer	56
1.3.1.5 Le rôle neuroprotecteur de la transferrine	60

1.3.2	LES ACIDES BILIAIRES : STRUCTURE, FONCTION ET ROLE NEUROPROTECTEUR	62
1.3.3	ARTICLE 1. <i>REVIEW : THE BILE ACIDS URSO- AND TAUROURSODEOXYCHOLIC ACID AS NEUROPROTECTIVE THERAPIES IN RETINAL DISEASE</i>	62
1.4	LA RECHERCHE TRANSLATIONNELLE : DEFINITIONS	79
2	<u>OBJECTIF DU TRAVAIL</u>	81
3	<u>RESULTATS</u>	83
3.1	ARTICLE 2: <i>IRON IS NEUROTOXIC IN RETINAL DETACHMENT AND TRANSFERRINE CONFERS NEUROPROTECTION</i>	83
3.2	ARTICLE 3: <i>ORAL URSODEOXYCHOLIC ACID CAN PROTECT PHOTORECEPTORS IN RETINAL DETACHMENT</i>	115
4	<u>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u>	154
4.1	DISCUSSION.....	154
4.1.1	LE DECOLLEMENT DE RETINE : DE LA PATHOLOGIE CHEZ L'HOMME AUX MODELES ANIMAUX	154
4.1.2	TOXICITE DU FER ET ROLE NEUROPROTECTEUR DE LA TRANSFERRINE DANS LE DECOLLEMENT DE RETINE	157
4.1.3	L'EFFET NEUROPROTECTEUR D'UDCA DANS LE DECOLLEMENT DE RETINE.....	159
4.1.4	LE LIEN ENTRE LES ACIDES BILIAIRES, LE FER ET LA TRANSFERRINE	163
4.2	PERSPECTIVES	165
5	<u>ANNEXES</u>	167
5.1	ANNEXE 1	167
5.2	ANNEXE 2	168
	<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	169
	<u>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</u>	181

1 Introduction

1.1 Anatomie et physiologie de la rétine

1.1.1 Anatomie et physiologie de l'œil

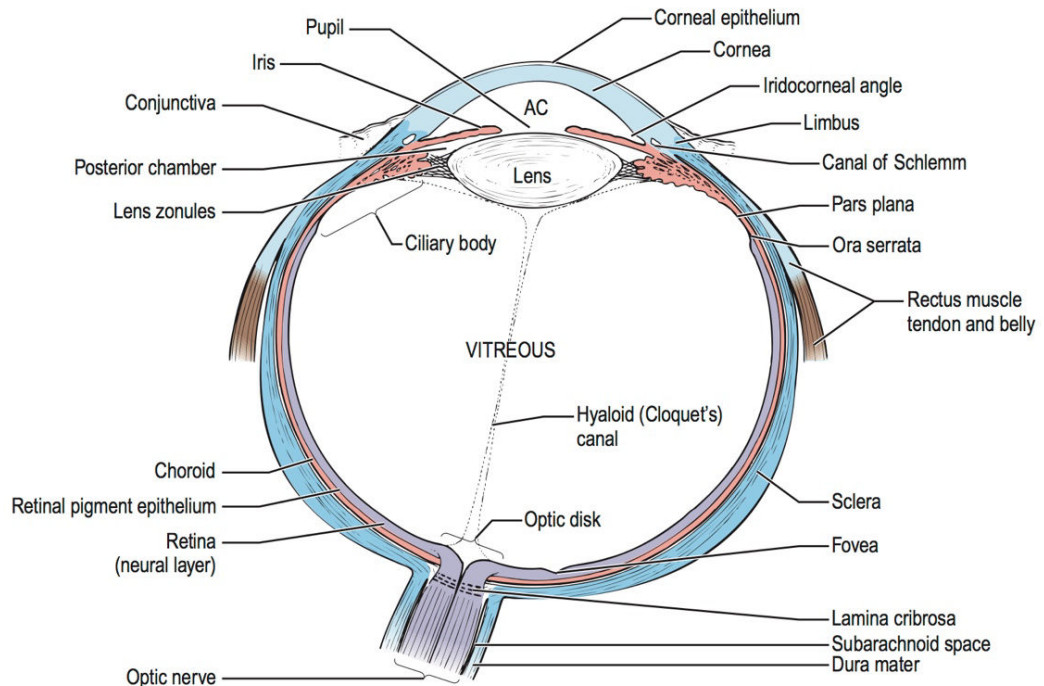
L'œil est l'organe de la vision. Il mesure environ 25 mm de diamètre et présente un volume de 5 ml chez l'homme. Il est formé schématiquement par un contenant et un contenu. Le contenant est représenté par la paroi du globe oculaire et le contenu par les « milieux » transparents.

La paroi du globe oculaire est constituée de 3 tuniques : (Figure 1)

- Une tunique externe fibreuse composée par la sclérotique en arrière (4/5) et la cornée en avant (1/5). La sclérotique est la plus résistante des tuniques de l'œil, elle le protège des dégâts mécaniques et soutient sa structure. La cornée est la première lentille transparente rencontrée par la lumière dans son trajet optique et représente 2/3 du pouvoir réfractif de l'œil. Autour de la cornée, la partie antérieure de la sclère est tapissée par la conjonctive, une muqueuse transparente qui produit un mucus lubrifiant.
- Une tunique intermédiaire vascularisée, l'uvée, est formée par la choroïde en arrière (2/3) et par le corps ciliaire et l'iris en avant (1/3). La choroïde assure l'oxygénation et la nutrition de la rétine externe. Le corps ciliaire sécrète l'humeur aqueuse. L'iris présente un diaphragme circulaire central, la pupille, qui se dilate ou se contracte selon l'intensité de la lumière, grâce à l'action des muscles lisses de l'iris.
- Une tunique interne sensorielle, la rétine. Elle est au contact du vitré. La rétine est constituée de la rétine neurosensorielle et de l'épithélium pigmentaire de la rétine (EPR).

Figure 1. Schéma de l'œil humain.

- Coupe horizontale montrant la disposition des 3 tuniques principales de l'œil : la tunique externe corneosclérale (bleue) ; la tunique intermédiaire, l'uvée (rouge) ; et la tunique interne sensorielle, la rétine (violet). Les milieux transparents sont : l'humeur aqueuse remplissant la chambre antérieure (AC) de l'œil, le cristallin (*lens*) et le vitré (*vitreous*).



- Source : d'après *The Eye*, 4th Edition, J.V. Forrester (Ed), Elsevier, 2016

Les « milieux » transparents (Figure 1) assurent la transmission de la lumière, de la cornée vers la rétine :

- L'humeur aqueuse est le liquide qui remplit la chambre antérieure de l'œil, entre la face postérieure de la cornée et la face antérieure du cristallin
- Le cristallin est une lentille flexible, biconvexe et convergente, amarrée aux procès ciliaires, en arrière de l'iris. Il détermine 1/3 du pouvoir réfractif de l'œil.
- Le vitré est un gel constitué de 90% d'eau, entouré d'une fine membrane : la hyaloïde.

L'œil possède également quatre annexes :

- l'orbite, cavité osseuse recouverte d'une membrane fibro-élastique (la périorbite), qui joue un rôle de protection
- les muscles oculomoteurs, qui permettent les mouvements oculaires. On distingue 4 muscles droits : supérieur, inférieur, interne et externe, et 2 muscles obliques : grand oblique (ou oblique supérieur) et petit oblique (ou oblique inférieur).
- les paupières, membranes cutanéomuqueuses et cartilagineuses permettant une isolation du rayonnement électromagnétique, l'étalement du film de larmes, et la protection de la cornée.
- la glande lacrymale principale, situé dans l'angle supéro-externe de l'orbite, secrète 40 % des larmes, le reste étant produit par des glandes accessoires.

1.1.2 Anatomie macroscopique de la rétine

La rétine est une tunique fine et transparente, légèrement rosée. Elle s'étend de l'ora serrata en avant jusqu'au nerf optique au pôle postérieur du globe oculaire. L'ora serrata est la zone où la limite antérieure de la rétine est en continuité avec l'épithélium non pigmenté de la pars plana du corps ciliaire. Sa face externe est en rapport avec la membrane de Bruch et la choroïde, par l'intermédiaire de l'EPR. Sa face interne est au contact du corps vitré. Le vitré est solidement attaché à la rétine au niveau de la base du vitré, de la papille, de la macula et au-dessus des vaisseaux sanguins rétinien.

On peut distinguer plusieurs zones anatomiques : (Figure 2)

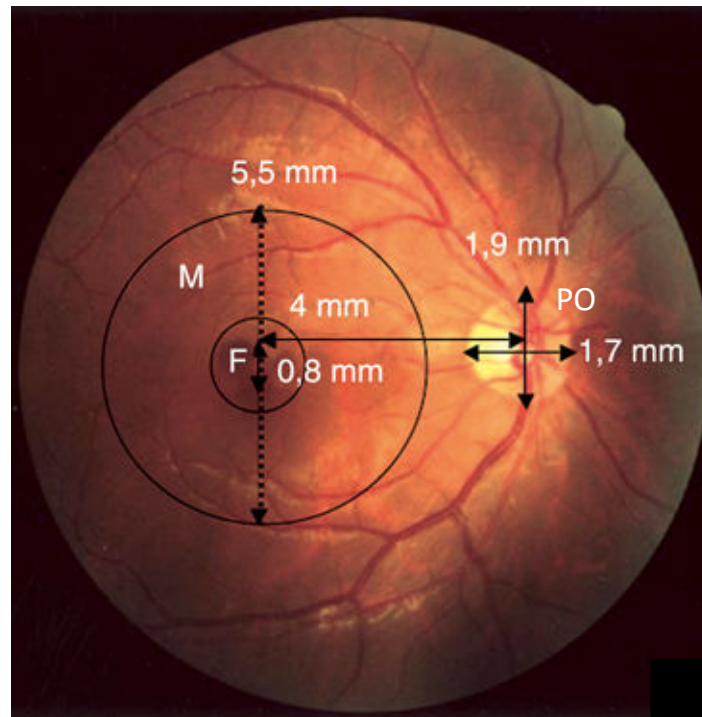
- la papille optique ou tête du nerf optique, visible sous la forme d'un disque. Sa couleur est jaune rosé. Son diamètre moyen est de 1.9 mm dans son axe vertical et 1.7 mm dans son axe horizontal. Elle présente 2 zones : une excavation centrale dépourvue des fibres

nerveuses, traversée par les branches des artères et veines rétiniennes, et un anneau neuro-rétinien contenant les fibres nerveuses qui forment le nerf optique.

- la macula représente la zone centrale de la rétine postérieure, de 5.5 mm de diamètre. Son centre est situé à 4 mm en temporal et 0.8 mm en inférieur par rapport au centre de la papille. La fovéa représente une zone centrale de 1.5 mm de diamètre formant une dépression. Son centre (0.35 mm) est la fovéola. Elle est la zone la plus mince de la rétine très riche en cônes et pigments maculaires (lutéine et zéaxanthine : pigment xantophylle). Son fond est reconnu comme le point central ou umbo. La fovéa et sa périphérie (une zone d'environ 0.5 mm de diamètre) sont dépourvues de capillaires rétiniens. On appelle cette zone la zone avasculaire centrale.
- La périphérie rétinienne est divisée en proche périphérie, une zone de 1.5 mm autour de la région maculaire, moyenne périphérie qui correspond à une zone de 3 mm en arrière et l'extrême périphérie qui s'étend sur 10 mm du côté nasal et sur 16 mm du côté temporal. Au niveau de l'extrême périphérie de la rétine, le vitré est adhérent sur 2 à 6 mm. Cette zone d'adhérence est appelée la base du vitré.

Figure 2. Anatomie macroscopique de la rétine en rétinophotographie couleur.

Papille optique (PO), macula (M), fovéa (F)



Source : d'après *EMC Ophtalmologie*, chapitre « Anatomie de la Rétine », Francine Behar-Cohen et collègues, 2009.

1.1.3 Anatomie microscopique de la rétine

La rétine est composée de deux tuniques juxtaposées : la rétine neurosensorielle et l'EPR (Figure 3). L'adhérence entre ces deux structures est peu solide. La rétine neurosensorielle est constituée de 6 types de cellules neuronales (Figure 3) : deux types de photorécepteurs (les cônes et les bâtonnets) (Figure 4), les cellules horizontales, bipolaires, amacrines et ganglionnaires, ainsi que 3 types de cellules gliales : les cellules de Müller, les astrocytes et les cellules microgliales. L'EPR est une monocouche constituée de 4 à 6 millions de cellules hexagonales et prolongé en avant par l'épithélium pigmentaire du corps ciliaire. L'EPR occupe une situation stratégique, séparant les photorécepteurs (à sa face interne) de la membrane de Bruch et la choroïde (à sa face externe).

Classiquement, on distingue de l'extérieur vers l'intérieur du globe oculaire les couches suivantes (Figure 3) :

- Les cellules de l'EPR
- Les segments externes et internes de photorécepteurs
- La membrane limitante externe
- La couche nucléaire externe : composée des corps cellulaires de photorécepteurs.
- La couche plexiforme externe : composée des synapses entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires.
- La couche nucléaire interne : composée des noyaux des cellules horizontales, des cellules bipolaires, des cellules amacrines et de cellules gliales de Müller
- La couche plexiforme interne : composée de synapses entre les axones de cellules bipolaires et dendrites de cellules ganglionnaires.
- La couche de cellules ganglionnaires : la plus interne qui contient les noyaux des cellules ganglionnaires.
- La couche des fibres nerveuses constituée des axones des cellules ganglionnaires qui forment le nerf optique, reliant l'œil au cerveau
- La membrane limitante interne

La rétine est vascularisée par deux systèmes vasculaires différents :

- Le réseau capillaire rétinien, qui assure la vascularisation directe des couches rétiniennes internes. Il dépend de l'artère centrale de la rétine, branche de l'artère ophtalmique (carotide interne).
- Le réseau choroïdien, qui assure de façon indirecte la vascularisation de la rétine externe, puisque la rétine externe ne comporte pas de réseau capillaire. Les artères irriguant la choroïde sont les artères ciliaires postérieures, branches de l'artère

1.1.4 Physiologie de la rétine

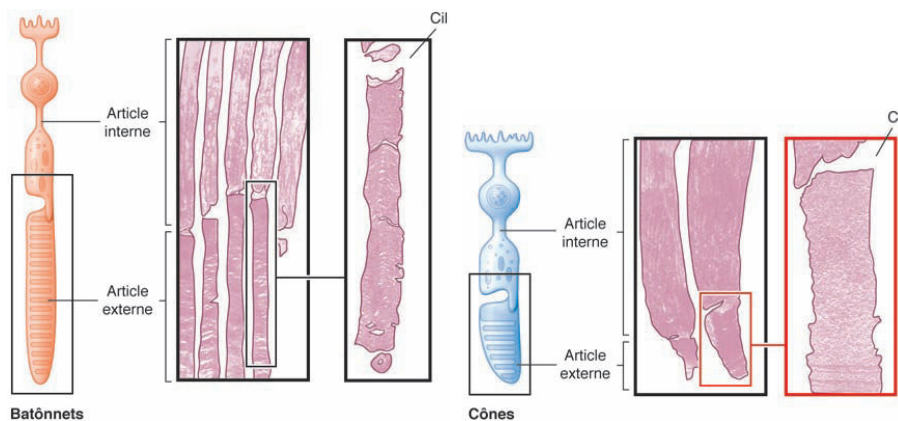
1.1.4.1 La rétine neurosensorielle

La rétine neurosensorielle est une unité fonctionnelle du système nerveux central (SNC) dont le rôle principal est la phototransduction et la neurotransmission rétinienne, permettant la conversion d'un signal lumineux en un influx nerveux transmissible au cortex visuel.

1.1.4.1.1 Les photorécepteurs et la phototransduction

Les photorécepteurs ou cellules photoréceptrices sont des neurones sensoriels sensibles à la lumière. Il existe 2 types des photorécepteurs : les bâtonnets et les cônes (Figure 4).

Figure 4. Photorécepteurs



Source : d'après C. Arndt. *Décollements de rétine. Rapport de la Société Française d'Ophthalmologie*, 2011. Chapitre 3 : « Physiologie rétinienne »

Les bâtonnets sont responsables de la vision périphérique, de la détection du mouvement et de la vision nocturne (vision scotopique). Ce sont les photorécepteurs présentant la plus grande sensibilité, puisqu'un seul photon est capable d'exciter un bâtonnet. Les cônes sont responsables de la vision centrale, la vision diurne (vision photopique) et permettent de

différencier les couleurs. Il existe 3 types de cônes spécifiques avec un profil de longueur d'onde spécifique, dénommés selon la couleur centrale de leur spectre de sensibilité : verts (55 %), rouges (35 %) et bleus (10%). Les photorécepteurs sont des neurones très spécialisés, seuls capables d'assurer la phototransduction. Cette spécialisation se retrouve au niveau de la morphologie de la cellule puisque toute la partie photosensible correspond au segment externe (disques membranaires). Le pigment visuel est le constituant le plus abondant du segment externe. Ce pigment est composé par l'association d'un chromophore (11-*cis* rétinol) et une protéine (opsine : rhodopsine pour les bâtonnets et iodopsines vertes, rouges et bleues pour les cônes).

La phototransduction englobe les étapes qui vont de la détection du photon lumineux jusqu'à l'ébauche d'une réponse sensorielle. Il s'agit de la transformation d'une énergie électromagnétique en une énergie métabolique qui correspond à la genèse d'un signal électrophysiologique. La cascade biochimique de la phototransduction correspond à 4 cycles métaboliques qui conduisent à l'hyperpolarisation du photorécepteur. Lorsque le 11-*cis* rétinol absorbe un photon, il passe à sa forme tout-*trans*. On assiste donc à sa séparation de l'opsine et à son activation. Cette étape conduit à l'activation d'une transducine, puis d'une phosphodiesterase, et finalement à l'hydrolyse du GMP cyclique (GMP-c). L'hydrolyse du GMP-c provoque la fermeture des canaux cationiques entrants de la membrane plasmique (à Na^+ et Ca^{2+}), une diminution relative des charges positives intracellulaires, et l'hyperpolarisation du photorécepteur.

1.1.4.1.2 La neurotransmission rétinienne

Au niveau de la couche plexiforme externe, l'hyperpolarisation du photorécepteur consécutive à la stimulation lumineuse est responsable d'une diminution de la libération du neurotransmetteur glutamate, fondement de la transmission de l'information aux cellules bipolaires. Entre les photorécepteurs et les cellules ganglionnaires, il existe un circuit de

traitement et de compression de l'information visuelle par des interneurons (cellules bipolaires, amacrines, horizontales). La voie suivie par la neurotransmission des signaux des cônes est : cônes, cellules bipolaires à cônes, cellules ganglionnaires. La voie de la transmission des signaux des bâtonnets est : bâtonnet, cellules bipolaires à bâtonnet, cellules amacrines/bipolaires à cônes, cellules ganglionnaires. Les cellules bipolaires à bâtonnets sont rarement en contact direct avec les cellules ganglionnaires. Les cellules bipolaires à cônes se différencient par leur forme en bipolaires naines, diffuses et à cônes bleus. A cette description verticale de la transmission des signaux s'ajoute les cellules horizontales qui sont perpendiculaires à l'axe de neurotransmission de la rétine. On distingue dans la rétine deux types de cellules excitables, celles qui se dépolarisent à la lumière et sont dites ON, et celles qui s'hyperpolarisent sont dits OFF.

Cette dualité ON/OFF permet d'isoler dans la rétine des circuits ON et des circuits OFF.

Il existe plusieurs types de cellules ganglionnaires :

- de grande taille (alfa) : à conduction rapide, elles véhiculent la perception de mouvements, et sont connectées à des cellules bipolaires diffuses.
- de petite taille (beta) : reliées à des cellules bipolaires naines, elles véhiculent la perception de détails (acuité visuelle).
- bistratifiées : connectées aux cellules bipolaires des cônes bleus, elles véhiculent la perception du contraste coloré bleu-jaune.
- biphaxifomes : connexions avec des cellules amacrines et des bâtonnets.

Les axones des cellules ganglionnaires forment la couche des fibres nerveuses qui vont constituer le nerf optique en arrière de la papille.

1.1.4.2 L'épithélium pigmentaire de la rétine

L'EPR est impliqué fondamentalement dans l'adhésion rétinienne, la formation de la barrière hémato-rétinienne externe et le renouvellement des articles externes des photorécepteurs, indispensables à la phototransduction.

L'EPR participe à son adhésion avec la rétine neurosensorielle grâce aux interdigitations de ses villosités avec les photorécepteurs, dans une matrice extracellulaire de type mucopolysaccharidique, mais surtout grâce à l'existence d'une pompe ionique (Na^+/K^+ ATPase) dans la membrane apicale de ses cellules. L'absorption d'eau est dirigée par le transport actif d'ions chlorure Cl^- et bicarbonate HCO_3^- de la rétine à la choroïde, dépendants de l'activité de la pompe Na^+/K^+ ATPase (Figure 5).¹ L'adhésion rétinienne est également assurée par la pression oncotique (la concentration de protéines est moindre dans l'espace virtuel sous-rétinien que dans le plasma) et la pression hydrostatique exercée par le vitré.

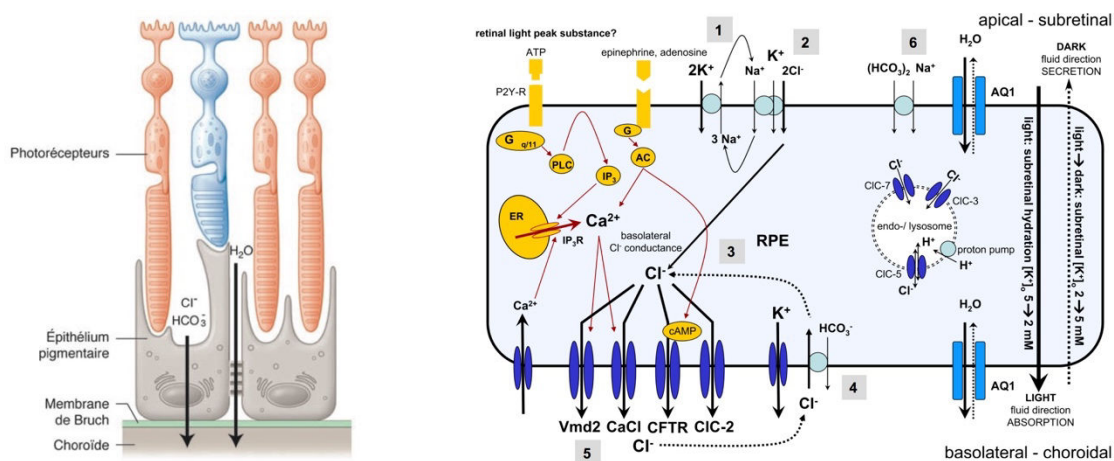
L'EPR assure le renouvellement et la phagocytose des segments externes des photorécepteurs. Chaque cellule de l'épithélium pigmentaire participe au renouvellement des articles externes de 30 à 40 photorécepteurs, ce qui représente environ 30.000 disques par jour. Puis les disques isolés dans des vacuoles d'endocytose sont véhiculés du pôle apical de la cellule de l'EPR vers sa partie basale où ils fusionnent avec les lysosomes primaires. Ces organites comportent un arsenal d'enzymes permettant la digestion complète des membranes constituant les segments externes. Après digestion, certains composants membranaires sont réutilisés par l'EPR ou les photorécepteurs pour assurer le renouvellement membranaire rapide. Les produits de dégradation sont ensuite excrétés vers la choroïde.

La capacité de phagocytose des cellules de l'EPR permet un renouvellement total des articles externes des bâtonnets en 10 jours. Ce processus présente une dépendance vis-à-vis du rythme circadien. Pour les bâtonnets, un pic de phagocytose s'observe le matin, immédiatement après le début de l'exposition à la lumière.

L'EPR participe également au cycle de la transduction visuelle par régénération du pigment visuel (11-*cis* rétinol) contenu dans les disques des bâtonnets. Il absorbe l'excès de photons (rôle photoprotecteur) grâce à la présence de mélanosomes (Figure 6) impliqués dans la synthèse et le stockage de la mélanine. Il participe à l'échange des nutriments entre l'espace sous-rétinien et la choroïde, synthétise et stocke de nombreux facteurs de croissance. Finalement, l'EPR forme la barrière hémato-rétinienne externe qui empêche le passage passif de macromolécules et contrôle les échanges entre la choroïde et la rétine externe (Figure 6).

Figure 5. Adhésion des photorécepteurs à l'épithélium pigmentaire.

Cette adhésion dépend d'un mécanisme actif de déshydratation de l'espace sous-rétinien. Il existe un passage continu d'eau de la face apicale à la face basolatérale des cellules de l'épithélium pigmentaire. Ce flux orienté est dirigé par le transport transépithélial d'ions chlorure (Cl^-) et bicarbonate (HCO_3^-) hors de l'espace sous-rétinien vers la choroïde. La pompe Na^+/K^+ -ATPase de la membrane apicale crée le gradient électrochimique nécessaire aux transports transépithéliaux (1). Les gradients de Na^+ et K^+ favorisent l'entrée d'ions Cl^- par le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ et le transporteur K^+/Cl^- (2). La concentration intracellulaire de Cl^- est élevée (3) et augmentée par un antiport basolatéral $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ (4). Les ions Cl^- quittent la cellule via plusieurs types de canaux de la membrane basolatérale, le cotransporteur K^+/Cl^- , les canaux à Cl^- calcium-dépendants (CaCl), les canaux à Cl^- voltage-dépendants (ClC), le canal CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) et le canal Vmd2 (product of the vitelliform macular dystrophy 2 gene) (5). Le gradient apical d'ions Na^+ favorise également l'entrée de HCO_3^- , par le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (6).



Source : d'après C. Arndt. *Décollements de rétine, Rapport de la Société Française d'Ophthalmologie*, 2011. Chapitre 3 : « Physiologie rétinienne » (gauche)
d'après Wimmers S et. al. *Prog Retin Eye Res.* 2007 (droit)

1.1.4.3 Les barrières hémato-oculaires

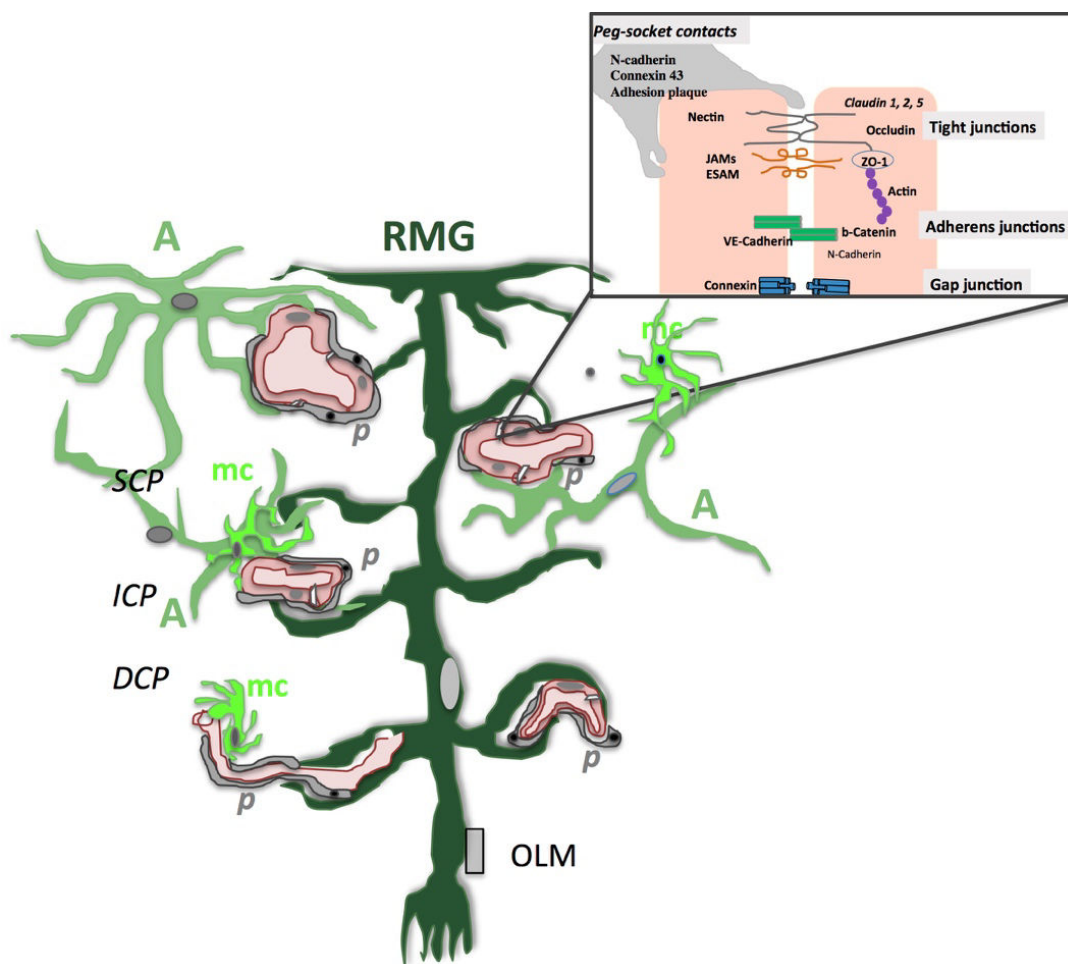
Les barrières hémato-oculaires comprennent la barrière hémato-aqueuse et la barrière hémato-rétinienne. La barrière hémato-aqueuse est située entre les cellules endothéliales des capillaires de l'iris, les cellules épithéliales de l'iris et les cellules épithéliales du corps ciliaire. Elle permet la régulation du débit et de la composition de l'humeur aqueuse.

La barrière hémato-rétinienne est classiquement divisée en interne et externe. La barrière hémato-rétinienne interne est constituée par un complexe neuro-glio-vasculaire formé par les jonctions serrées (*zonulæ occludens*) et adhérentes entre les cellules endothéliales des capillaires rétiniens, les péricytes, les astrocytes, les cellules rétiniennes gliales de Müller et la microglie (Figure 6).² La barrière hémato-rétinienne externe est principalement formée par des jonctions serrées et des jonctions adhérentes situées entre les cellules de l'EPR (Figure 7), les jonctions serrées de l'endothélium vasculaire choroïdien et la limitante externe. Les principaux groupes de protéines formant les jonctions serrées sont les claudines et les occludines.

Mais en dehors de l'existence de structures moléculaires jonctionnelles, les barrières sont aussi maintenues par des mécanismes actifs comme les transports vésiculaires sélectifs et les protéines d'efflux.² La barrière hémato-rétinienne sert à la protection et à l'homéostasie de la rétine et du vitré. Les barrières hémato-oculaires s'opposent à la pénétration des médicaments à l'intérieur du globe. Par ailleurs, leur dysfonctionnement est à l'origine de nombreuses maladies cécitantes.

Figure 6. La barrière hématorétinienne interne.

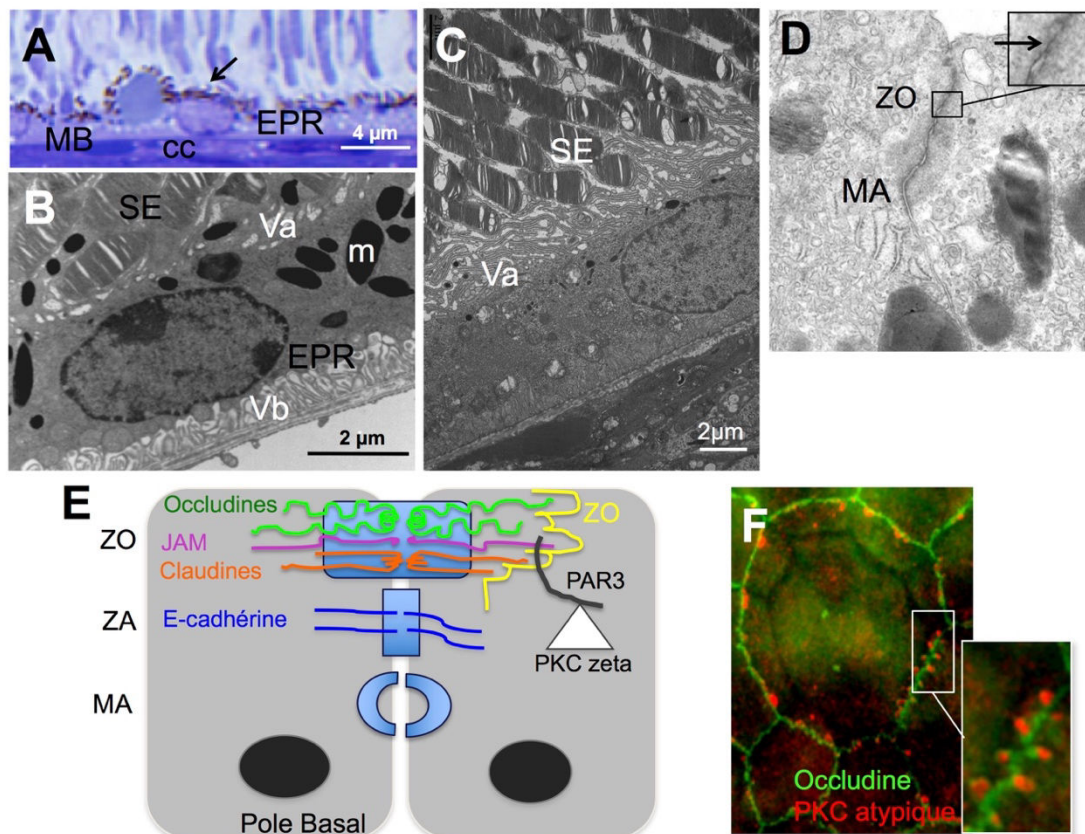
Représentation schématique du complexe neuro-glio-vasculaire formant la barrière hématorétinienne interne, composée de cellules endothéliales vasculaires, de péricytes (p), de cellules rétinienne gliales de Müller (RMG), d'astrocytes (A) et de la microglie (mc). Des projections de cellules rétinienne gliales de Müller sont présentes au niveau de tous les plexus vasculaires rétinien (superficiel, SCP; intermédiaire, ICP et profond, DCP), tandis que les astrocytes ne sont présents qu'au niveau du plexus superficiel. Dans l'encadré, magnification représentant le complexe jonctionnel entre les cellules endothéliales vasculaires rétinienne. Les jonctions serrées sont formées par l'occludine, les claudines 1, 2 et 5, les JAM-A et C, qui sont liées au cytosquelette d'actine par la ZO-1. Les jonctions adhérentes sont formées par la VE-cadhérine, la β -caténine et la N-cadhérine. Les jonctions Gap sont constituées par des héli-canaux de 6 connexines. La jonction péricytes-cellules endothéliales est composée principalement de N-cadhérine et de connexine-43.



Source : d'après Daruich A, Matet A et al. *Prog Retin Eye Res.* 2018

Figure 7. La barrière hématorétinienne externe.

A : Coupe histologique de l'épithélium pigmentaire (EPR) montrant les mélanosomes (flèche) en situation apicale et la choriocapillaire (cc) à la face externe de la membrane de Bruch (MB). **B** : Microscopie électronique à transmission montrant l'EPR de rat avec ses villosités apicales (Va) englobant les segments externes des photorécepteurs (SE) et ses villosités basales (Vb). Les mélanosomes (m) sont en situation apicale. **C** : Image en microscopie électronique à transmission de l'EPR de rat montrant l'importance des villosités apicales (Va) qui entourent les segments externes des photorécepteurs (SE). **D** : Image en microscopie électronique à transmission de la jonction intercellulaire montrant la zonula occludens (ZO) (agrandissement en haut à gauche) et la macula adherens (MA). **E** : Représentation schématisée de la jonction apicale épithéliale qui comprend la zonula occludens (ZO), la zonula adherens (ZA) et la macula adherens (MA). **F** : Image des jonctions intercellulaires de l'EPR monté à plat avec un marquage en vert de l'occludine et en rouge de la PKC-zeta atypique qui se localise dans les boucles de l'occludine en « fermeture éclair ».



Source : d'après F. Behar-Cohen, A. Daruich, A Matet, P Crisanti-Lassiaz, *Cédèmes Maculaires, Rapport de la Société Française d'Ophtalmologie*, 2016. Chapitre 3 : « Physiopathologie de l'oedème maculaire »

1.2 Le décollement de rétine

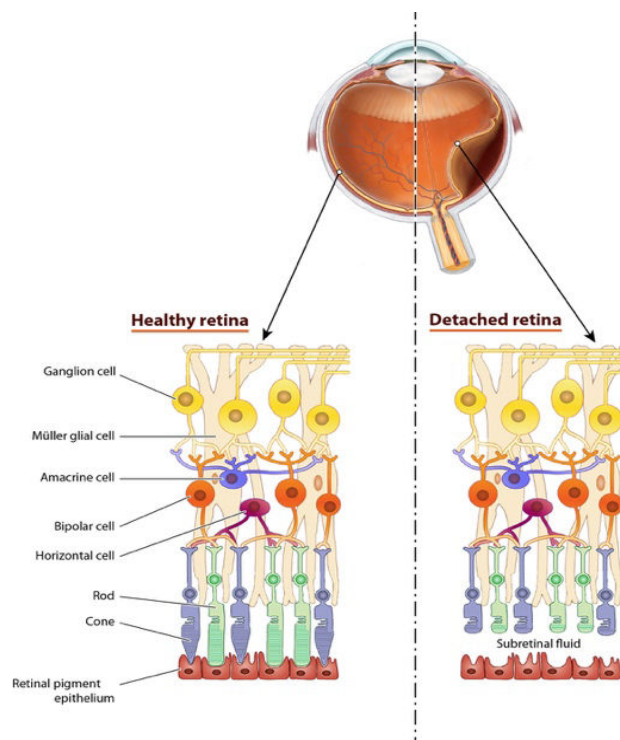
1.2.1 Aspects cliniques

1.2.1.1 Définition

Le décollement de rétine (DR) est défini comme la séparation de la rétine neurosensorielle de l'EPR. La rétine externe se trouve donc séparée de la vascularisation choroïdienne sous-jacente, qui assure ses apports métaboliques (Figure 8), par une accumulation de LSR dont l'origine reste encore imprécise. Se développe ensuite une dégénérescence des photorécepteurs qui conduit à une altération irréversible de la vision.

Figure 8. Le décollement de rétine.

Schéma montrant la séparation de la rétine neurosensorielle de l'épithélium pigmentaire rétinien, avec accumulation de liquide sous-rétinien.



Source : d'après Daruich A et al. Iron is neurotoxic in retinal detachment and transferrin confers neuroprotection. *Sciences Advances*. 2019

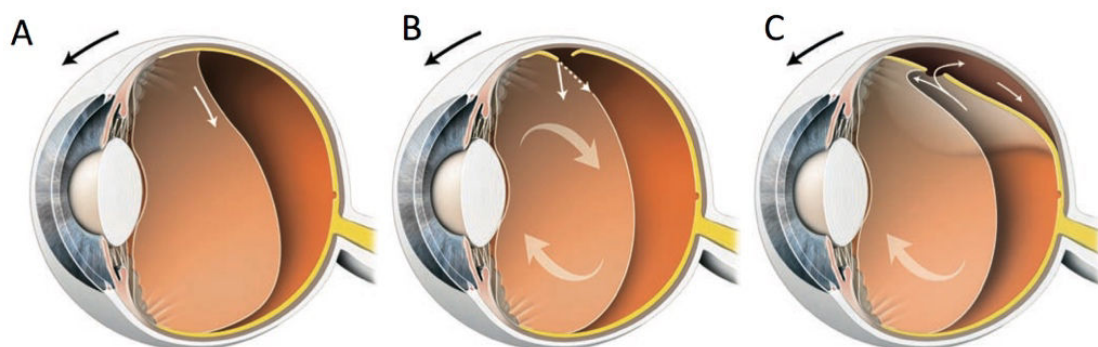
Il existe 3 types de DR : le DR rhéigmatogène, le DR tractionnel et le DR exsudatif, dont les facteurs étiologiques et physiopathologiques, les manifestations cliniques et la prise en charge sont différents.

1.2.1.2 Le Décollement de rétine rhéigmatogène

Le DR rhéigmatogène est secondaire à une ou plusieurs déchirures de la rétine (déchirure ou trou). La survenue d'une déchirure rétinienne peut avoir une origine vitréogène ou rétinogène. Dans le premier cas, la survenue d'une déchirure est secondaire à un décollement postérieur du vitré. Celui-ci est dû à des modifications du vitré, liées principalement à l'âge, qui entraînent une liquéfaction et un collapsus du gel vitréen. Il en résulte des tractions qui peuvent entraîner des déchirures au niveau de la base d'insertion du vitré, c'est-à-dire en périphérie de la rétine. Le vitré liquéfié pourrait ainsi passer à travers la déchirure et créer la séparation entre la rétine neurosensorielle et l'EPR (Figure 9).

Figure 9. Décollement de rétine rhéigmatogène.

Effet du décollement postérieur du vitré sur l'apparition de décollement de rétine. A. Le vitré liquéfié crée des tractions sur la rétine périphérique. B. Une déchirure peut ainsi survenir, le plus souvent au niveau de la base du vitré. C. Les tractions et les courants liquidiens à travers la déchirure peuvent conduire à un décollement de rétine.



Source : d'après JF. Girmens. *Décollements de rétine, Rapport de la Société Française d'Ophthalmologie*, 2011. Chapitre 5 : « Physiopathologie »

Dans le cas des DR d'origine rétinogène, un trou est à l'origine du décollement de DR. Le trou est en général secondaire à un amincissement de la rétine neurosensorielle, dû à une myopie forte ou à des lésions rétinienne prédisposantes (palissades, rétinosis) qui augmentent la fragilité rétinienne.

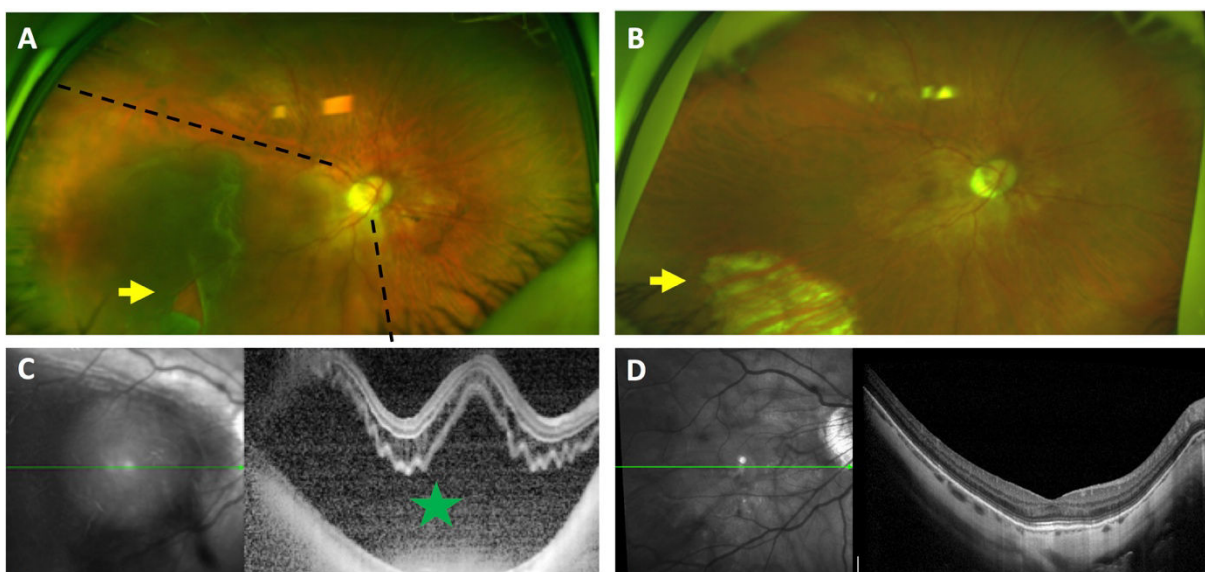
Les principaux facteurs de risque de survenue d'un DR rhégmato-gène sont :

- L'âge supérieur à 50 ans
- La myopie forte
- Les lésions prédisposantes rétinienne
- Les traumatismes ou un antécédent d'intervention chirurgicale intraoculaire (vitrectomie, phacoémulsification)
- Un antécédent d'uvéite postérieure
- Un antécédent personnel ou familial de DR
- L'incidence du DR rhégmato-gène est d'environ 1 personne sur 10.000.³ Les principaux signes fonctionnels évocateurs sont des éclairs lumineux (phosphènes), des mouches volantes (myodésopsies), un voile noir sectoriel (amputation du champ visuel), des déformations des lignes droites (métamorphopsies) et enfin une baisse d'acuité visuelle lorsque le DR atteint la macula. L'examen du fond d'œil permet de constater le soulèvement rétinien et la ou les déchirures à l'origine du DR (Figure 10), et d'orienter la prise en charge chirurgicale en urgence. Le choix de la technique chirurgicale dépend principalement de la configuration du décollement de rétine. Il existe deux techniques principales : la chirurgie *ab externo* et la chirurgie endoculaire (vitrectomie). Dans les deux cas, le but de la chirurgie est de lever les tractions vitréennes sur la déchirure, d'arrêter les courants de liquide vers l'espace sous-rétinien, et de créer une cicatrisation à long terme de la déchirure (rétinopexie, Figure 10), afin de rétablir le contact entre

la rétine neurosensorielle et l'EPR. La chirurgie *ab externo* consiste en la réalisation d'une indentation rétinienne, à l'aide d'un matériel externe en silicone ou spongieux fixé sur la sclère, et une rétinopexie par cryoapplication, qui peuvent également être associées à une ponction trans-sclérale de drainage du LSR, et à une injection d'air ou de gaz dans la cavité vitrénne. La vitrectomie (Figure 10) permet l'ablation directe du vitré, la réalisation d'une rétinopexie (par laser ou cryoapplication), et le drainage du LSR par voie interne, qui doit être associé à un remplissage de la cavité vitrénne par air, gaz ou huile de silicone, assurant un tamponnement de la rétine.

Figure 10. Rétinophotographie et tomographie par cohérence optique chez un patient présentant un décollement de rétine, avant et après prise en charge chirurgicale.

A. Rétinophotographie couleur grand champ montrant un décollement de rétine inférieur (soulèvement rétinien délimité par les traits noirs) en rapport à une déchirure rétinienne (flèche jaune). B. Rétinophotographie couleur grand champ du même patient un mois après vitrectomie, rétinopexie (cicatrice de cryoapplication au niveau de la déchirure, flèche jaune) et tamponnement par gaz. La rétine est réappliquée sur 360 degrés. C. Tomographie par cohérence optique du même patient montrant la séparation de la rétine neurosensorielle de l'épithélium pigmentaire rétinien par du liquide sous-rétinien (étoile verte). D. Tomographie par cohérence optique du même patient après vitrectomie montrant la réplication rétinienne et l'absence de liquide sous-rétinien.



Source : Alejandra Daruich, Unité de chirurgie vitréo-rétinienne, Hôpital ophtalmique Jules-Gonin, Lausanne, Suisse (2016).

1.2.1.3 Les décollements de rétine tractionnels et exsudatifs

Les DR tractionnels sont secondaires à des tractions exercées sur la rétine neurosensorielle par un tissu fibreux. Ils surviennent notamment dans un contexte de rétinopathie, comme la rétinopathie diabétique ou la rétinopathie du prématuré, où des proliférations fibrovasculaires secondaires à une non-perfusion rétinienne provoquent et entretiennent le décollement de rétine. Le traitement est chirurgical, en général par vitrectomie, qui permet de lever les tractions sur la rétine, et de la réappliquer.

Les DR exsudatifs sont secondaires à des pathologies vasculaires, inflammatoires ou tumorales rétiniennes ou choroïdiennes. Elles sont à l'origine de l'accumulation de LSR, responsable de la séparation de la rétine neurosensorielle de l'EPR. Le traitement est dirigé vers la cause du DR et est le plus souvent médical ou physique (par laser ou photothérapie dynamique), ne relevant que très rarement d'une chirurgie.

1.2.2 Les mécanismes de mort cellulaire dans le décollement de rétine

Les 3 types de mort cellulaire les plus étudiés sont l'apoptose, l'autophagie et la nécrose, définies par leur apparence morphologique en microscopie.⁴ Les caractéristiques morphologiques de chaque forme de mort cellulaire sont les suivantes:

- Type I (apoptose) : condensation du noyau et du cytoplasme, aspect arrondi de la cellule, réduction du volume cellulaire et absorption par les phagocytes résidents.
- Type II (autophagie) : formation de grandes inclusions (autophagosomes et autolysosomes) dans le cytoplasme et absence de condensation et de fragmentation des cellules.

- Type III (nécrose): gonflement du cytoplasme et des organites, gain de volume cellulaire, rupture de la membrane plasmique et connections avec l'espace extracellulaire.⁵
- L'annexe 1 récapitule plus en détails les différents types de mort cellulaire.

La mort des photorécepteurs est la principale cause de perte visuelle lors d'un DR. Elle se produit dès 12 heures et atteint un pic entre 48 et 72 heures après la séparation de la rétine sensorielle de l'EPR.^{6,7} Les mécanismes conduisant à la mort des photorécepteurs sont multiples et non complètement élucidés.⁸ Plusieurs types de mort cellulaire ont été décrits dans le DR :

- Apoptose : Caspase-dépendante⁹ ou indépendante (impliquant AIF, *apoptosis-inducing factor*).¹⁰
- Nécrose : RIP (*receptor-interacting protein*)-kinase dépendante (necroptose).¹¹
- Autophagie : impliquant la participation des protéines ATG5 (*autophagy related 5*) et LC3-II (*light chain 3-II*).¹²
- Inflammation : des médiateurs tels que le TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*)¹³ et MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*)¹⁴ ont été impliqués.
- Stress du réticulum endoplasmique.^{15,16}

1.2.2.1 Apoptose

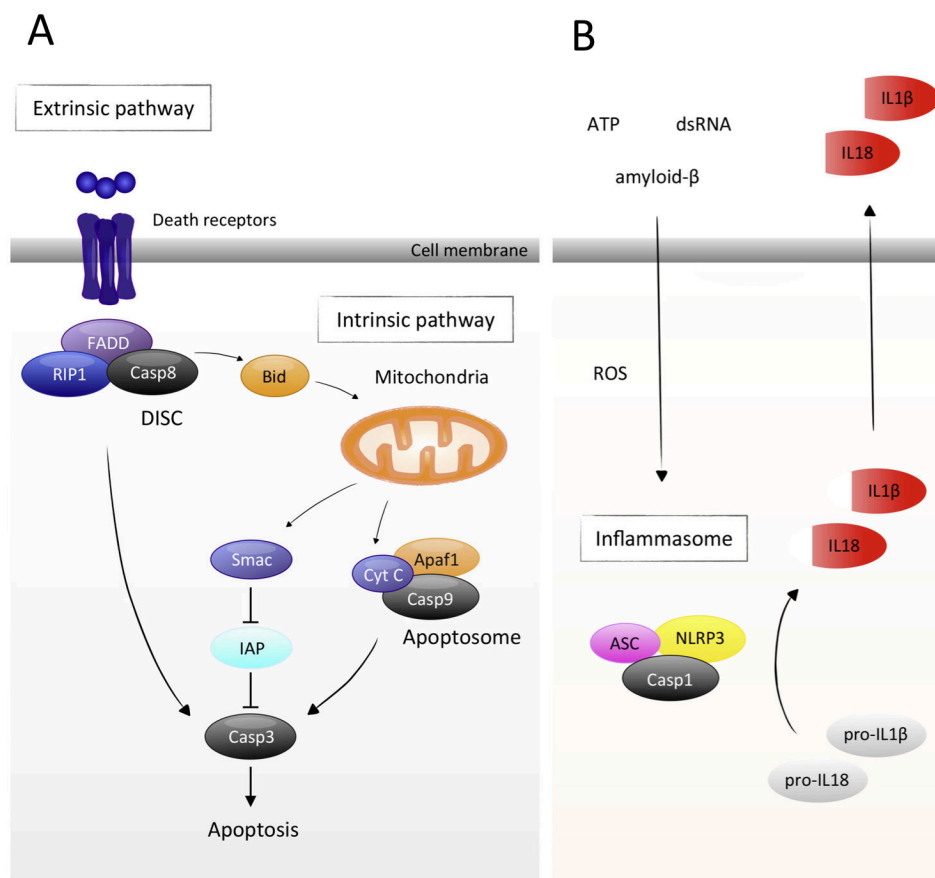
1.2.2.1.1 Apoptose caspase-dépendante

Quatre complexes peuvent induire l'activation des caspases (Figure 11) :⁸

- Le complexe DISC (*death inducing signaling complex*) qui intervient dans l'activation de caspase-8 (voie extrinsèque). La formation du complexe DISC est initiée par la liaison de ligands de mort extracellulaires, tels que le ligand Fas et le TNF- α , à leurs récepteurs de surface. Lors de l'activation, les récepteurs de mort subissent une multimérisation et recrutent FADD (*Fas-associated death domain*) et RIP1. FADD interagit à son tour avec caspase-8. L'oligomérisation de la caspase-8 dans le DISC entraîne son activation et le clivage des caspases effectrices en aval.
- L'apoptosome, qui active la caspase-9 (voie intrinsèque). L'apoptosome est un complexe protéique qui contient Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*), cytochrome c et caspase-9. Il est initié par la libération de protéines pro-apoptotiques des mitochondries. L'intégrité de la membrane mitochondriale est régulée par l'équilibre entre les protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (*B cell lymphoma 2*). Lorsque le signal pro-apoptotique est déclenché, des canaux Bax (*Bcl-2-associated X protein*) se forment au niveau de la membrane mitochondriale externe, ce qui entraîne la libération du cytochrome c et de Smac (*second mitochondria-derived activator of caspases*). Le cytochrome c libéré déclenche la formation de l'apoptosome en présence d'ATP, qui intervient dans le changement de conformation et l'activation de caspase-9. Smac conduit à l'activation des caspases par neutralisation des protéines AIP (*inhibitor of apoptosis*).
- Le PIDDosome (PIDD = *p53-induced death domain protein*), qui active la caspase-2. La caspase-2 activée agit en amont au niveau de la voie intrinsèque mitochondriale.
- L'inflammasome, qui active la caspase-1. L'activation de la caspase-1 conduit au clivage de la pro-IL (interleukine)-1 β et de la pro-IL-18 en leurs formes pro-inflammatoires.

Figure 11. Apoptose Caspase-dépendante.

- A. La voie extrinsèque est initiée par l'interaction des ligands à leurs récepteurs de mort à la surface des cellules. Les domaines de mort de ces récepteurs recrutent des molécules adaptatrices telles que FADD (Fas-associated death domain) et la caspase-8 (Casp8). La multimérisation de la caspase-8 dans le DISC (death inducing signaling complex) entraîne son activation et le clivage des caspases effectrices en aval telles que caspase-3 (Casp3). La voie intrinsèque est déclenchée par la libération de protéines pro-apoptotiques par les mitochondries. Le cytochrome c (Cyt c) libéré forme l'apoptosome avec Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) et la caspase-9 (Casp9). De plus, Smac (second mitochondria-derived activator of caspases) libéré participe à l'activation des caspases par neutralisation des protéines IAP (inhibitor of apoptosis). Il existe un dialogue croisé entre les voies extrinsèques et intrinsèques. La caspase-8 activée clive la protéine Bid, qui initie la libération de protéines pro-apoptotiques mitochondriales.
- B. L'inflammasome est formé en réponse à divers signaux tels que ROS (reactive oxygen species), adénosine triphosphate (ATP), β -amyloïde et acide ribonucléique double brin (RNAs). L'activation de la caspase-1 (Casp1) dans l'inflammasome conduit au clivage de pro-Interleukine (IL) β et de pro-IL18 en leurs formes pro-inflammatoires matures et favorise leur sécrétion. ASC (PYCARD): Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD. NLRP3 (CIAS1) : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3



Source : d'après Murakami et al. *Prog Retin Eye Res* . 2013

Une activation précoce de l'apoptose a été démontrée dans un modèle de DR expérimental.⁶ Des photorécepteurs TUNEL-positifs ont été détectés dès 1 à 3 jours après induction d'un DR dans différents modèles animaux et dans des échantillons de rétine humaine présentant un DR rhégmotogène.^{7,10} L'activation des caspases dans les photorécepteurs apoptotiques après un DR expérimentalement induit a également été décrit.^{9,17} Dans la rétine de rat après DR, il existe une augmentation de l'activité enzymatique des caspases initiatrices (caspase-8 et -9) et des caspases effectrices (caspase-3 et -7).^{9,17} En outre, il a été démontré que les niveaux d'expression de certains ligands et récepteurs qui activent l'apoptose par voie extrinsèque, tels que TNF- α , Fas-L et Fas, augmentent avant et pendant le processus de mort des photorécepteurs.^{13,18} Des antagonistes du TNF- α et Fas empêchent l'activation des caspases et diminuent la mort des photorécepteurs lors d'un DR.¹⁷ Paradoxalement, une injection intravitréenne de Z-VAD, un inhibiteur pan-caspase, n'empêche pas la mort des photorécepteurs après DR chez le rongeur¹¹, ce qui pourrait expliquer que les caspases ne sont pas le seul médiateur de la mort cellulaire lors d'un DR.

1.2.2.1.2 Apoptose caspase-indépendante

AIF est localisé dans l'espace intermembranaire mitochondrial et module la structure et la fonction du complexe I de la chaîne respiratoire, crucial à la survie cellulaire.¹⁹ Dans des conditions de stress, on observe le clivage et la translocation d'AIF dans le noyau où il participe à la chromatinolyse, de manière indépendante des caspases.²⁰ De plus, AIF favorise également la mort cellulaire nécrotique en réponse aux agents alkylants de l'ADN (Figure 12).²¹

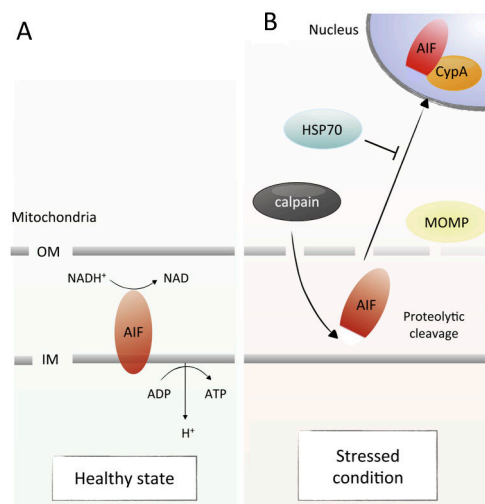
En conditions normales, AIF est situé dans le segment interne des photorécepteurs, mais il a été observé que AIF est localisé dans les noyaux des photorécepteurs après DR chez les rongeurs.¹⁰

En plus, la translocation nucléaire d'AIF dans les photorécepteurs en voie de disparition a été

montré dans la rétine humaine après DR,²² ce qui suggère l'implication des voies caspase-indépendantes dans le DR.

Figure 12. Apoptose caspase-indépendante : voie AIF (Apoptosis-inducing factor).

A. En conditions normales, AIF est situé dans la membrane interne de la mitochondrie et module sa fonction. AIF régule l'activité du complexe I et il est donc critique pour la phosphorylation oxydative des mitochondries et la survie des cellules. B. En revanche, dans des conditions de stress, AIF effectue une translocation vers le noyau. La libération mitochondriale d'AIF implique la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP) et le clivage protéolytique. L'AIF libéré interagit avec la cyclophiline A et se lie directement à l'acide désoxyribonucléique et à l'acide ribonucléique du noyau, induisant ainsi une chromatinolyse.



Source : d'après Murakami et al. *Prog Retin Eye Res* . 2013

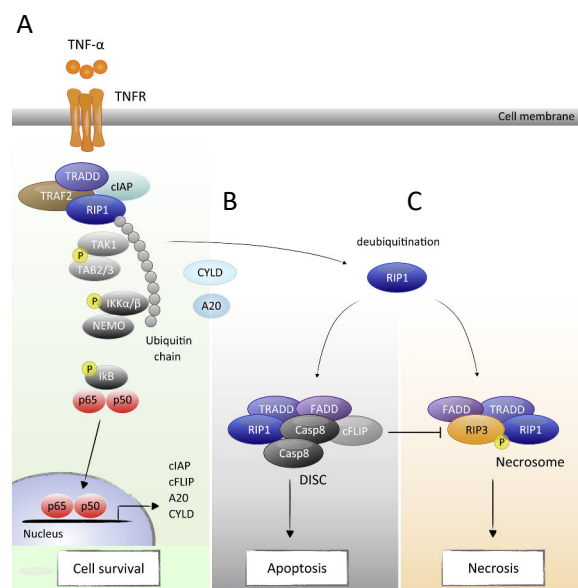
1.2.2.2 RIP kinase et nécroptose

RIP1 et 3 sont des médiateurs critiques de la nécrose (Figure 13).⁸ La dé-ubiquitination de RIP1 conduit à la formation de complexes cytosoliques de mort. Ces complexes contiennent TRADD (*TNF receptor-associated death domain*), FADD, RIP1, caspase-8, et/ou RIP3, et interviennent dans l'apoptose ou la nécrose, en fonction de l'état cellulaire.²³ Dans des conditions où les caspases sont inhibées ou ne peuvent pas être activées efficacement, RIP1 interagit avec RIP3 et forme le nécrosome. Les mécanismes en aval par lesquels la RIP kinase provoque la nécrose

sont moins connus. Le nécrosome peut activer la protéine pro-nécroptotique *mixed lineage kinase domain-like protein* (MLKL) qui s'insère dans les membranes bilipidiques des organites et de la membrane plasmique, entraînant l'expulsion du contenu cellulaire dans l'espace extracellulaire.²⁴ La phosphoglycérate mutase 5 (PGAM5), une phosphatase mitochondriale située dans la membrane externe de la mitochondrie, est un autre substrat de la RIP kinase. L'interaction de RIP3 avec PGAM5 conduit à la fragmentation mitochondriale.²⁵

Figure 13. Voie RIP (receptor-interacting protein).

A. À la suite de l'activation de tumor necrosis factor (TNF)- α , RIP1 forme un complexe associé à la membrane avec les gènes TRADD (NF receptor-associate death domain), TRAF2 (TNF receptor-associated factor) et cIAP (cellular inhibitor of apoptosis). cIAP ubiquitine RIP1, qui active NF- κ B (nuclear factor-kappa B). Sa translocation nucléaire favorise la production de gènes de survie, tels pIAP, c-FLIP (cellular FLICE-like inhibitory protein), CYLD et A20. B et C. RIP1 bascule sa fonction vers un régulateur de la mort cellulaire lorsqu'elle est désubiquitinée par CYLD ou A20. La desubiquitination de RIP1 supprime sa capacité à activer le NF- κ B, et conduit à la formation de complexes cytosoliques favorisant la mort. Ces complexes contiennent TRADD, FADD (Fas-associated death domain), RIP1, caspase-8 (Casp8), c-FLIP et/ou RIP3, et interviennent dans l'apoptose ou la nécrose en fonction de l'état cellulaire. La multimérisation de la caspase-8 dans le DISC (death inducing signaling complex) induit un changement conformationnel de sa forme active, induisant ainsi une apoptose. L'activité catalytique du complexe hétérodimère caspase-8-c-FLIP clive et inactive RIP1 et RIP3. Dans les cas où les caspases/c-FLIP sont inhibées ou ne peuvent pas être activées efficacement, RIP1 forme le nécrosome avec RIP3, favorisant ainsi la nécrose.



Source : d'après Murakami et al. *Prog Retin Eye Res* . 2013

RIP3 est à peine détectable dans la rétine normale, mais son expression augmente de plus de 10 fois après DR.¹¹ Il a été rapporté que l'inhibition de RIP diminue les altérations histologiques des couches rétinienne externe et améliore les tracés de l'électrorétinogramme dans un modèle de DR chez le rat.²⁶ Des études récentes ont montré que, lorsque les voies des caspases sont bloquées, RIP kinase favorise la nécrose et contre-balance l'inhibition de l'apoptose.²⁷

1.2.2.3 Perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP) et mort cellulaire

Les mitochondries agissent comme des régulateurs de la mort cellulaire par la perméabilisation de leur membrane externe et la libération des protéines de l'espace intermembranaire, notamment :

- le cytochrome c, qui déclenche la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase-9,
- AIF qui intervient dans la mort cellulaire indépendante de la caspase, qu'il s'agisse de l'apoptose ou de la nécrose,
- et Smac qui participe à l'activation des caspases en interagissant avec les protéines IAP, et à la nécrose dépendante de RIP kinase. Par conséquent, la MOMP est impliquée à la fois dans la signalisation apoptotique et nécrotique.⁸

Il existe au moins deux mécanismes distincts pour la MOMP. Premièrement, les protéines de la famille Bcl-2 pro-apoptiques, telles que Bax et Bak forment des pores de membrane par oligomérisation, permettant principalement la libération du cytochrome c.²⁸ La MOMP peut également être induite par l'ouverture de canaux mitochondriaux préexistants, tels que les PTPC (*permeability transition pore complex*), préférentiellement impliqués dans la mort cellulaire nécrotique.²⁹

La libération mitochondriale de cytochrome c et d'AIF contribue à la mort des photorécepteurs après DR.^{10,22} Il a été montré que la perte des photorécepteurs après DR était considérablement réduite chez les souris Bax -/-.³⁰ De la même manière, l'inhibition de la MOMP par suppression de l'activité de caspase-9 et la réduction de la translocation d'AIF, diminuait la mort des photorécepteurs dans un modèle de DR chez la souris.²²

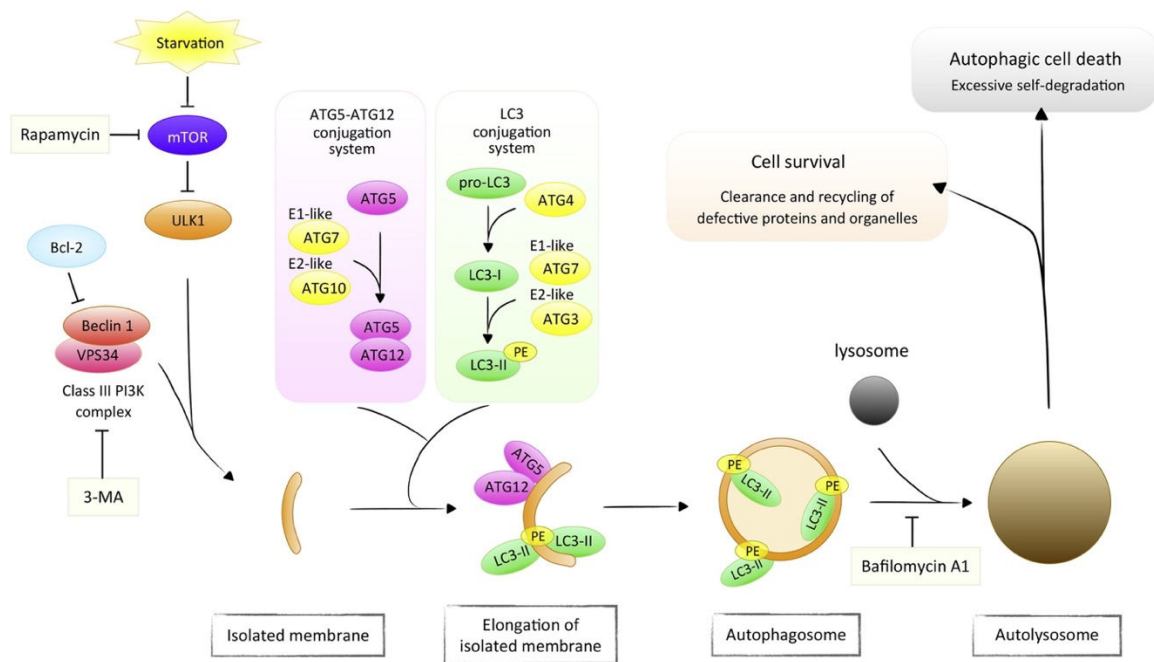
1.2.2.4 Famille Atg et autophagie

L'autophagie désigne la dégradation d'une partie du cytoplasme de la cellule par ses propres lysosomes.³¹ La formation de l'autophagosome nécessite la participation des protéines atg (autophagie) et de LC3-II.⁸ L'activation de l'autophagie semble être un mécanisme protecteur contre la mort des photorécepteurs. Cependant, l'autophagie peut également induire la mort cellulaire lors d'une activation excessive (Figure 14).^{8,32}

Il a été rapporté que les niveaux d'Atg5 et de LC3-II augmentent de manière dépendante de Fas, dans un modèle de DR chez le rat.¹² L'inactivation de cette voie aggrave la perte des photorécepteurs, et augmente l'activité de caspase-8.¹² Ces résultats suggèrent que Fas active les voies autophagiques et apoptotiques, où l'autophagie régule négativement l'apoptose dépendante des caspases. Cependant, les mécanismes détaillés n'ont pas été complètement élucidés. De la même manière, l'inhibition du TNF- α conduit à une augmentation de l'autophagie, une diminution de l'apoptose et une meilleure survie des photorécepteurs dans un modèle de DR chez la souris.³³ De plus, il a été récemment démontré l'implication de l'*Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α* dans l'induction précoce de l'autophagie, dans un modèle de DR chez le rat.³⁴

Figure 14. Voies d'Autophagie

L'activation de l'autophagie par inhibition de mTOR (mechanistic target of rapamycin), régle négativement ULK1 (Unc-51 like autophagy activating kinase) et la PI (phosphoinositide) 3-kinase de classe III. L'activation de la PI3-kinase de classe III en interaction avec Beclin-1 est une étape-clé dans la formation de la membrane d'isolation. L'élongation de la membrane d'isolation nécessite deux systèmes de conjugaison de type ubiquitine: le système de conjugaison Atg (autophagie)-5-Atg12 et le système de conjugaison LC3 (light chain 3). Le recrutement du complexe Atg5-Atg12 et LC3-II facilite la formation d'autophagosome. Après fusion avec le lysosome, le contenu autophagosomal est dégradé dans l'autolysosome. L'autophagie est essentielle à la survie des cellules car elle intervient dans l'élimination et le recyclage des protéines et des organites défectueux. Néanmoins, l'autophagie induit également la mort cellulaire via une auto-dégradation excessive. bcl-2 : B-cell lymphoma 2



Source : d'après Murakami et al. *Prog Retin Eye Res* . 2013

1.2.2.5 Inflammation et mort cellulaire

L'augmentation des médiateurs inflammatoires a été rapportée dans le vitré des patients atteints de DR, incluant ceux faisant partie du système du complément.³⁵ Le rôle de la voie alterne du complément a été récemment étudié dans un modèle murin de DR.³⁶ Il a été observé que la voie alterne du complément favorisait la mort précoce des photorécepteurs, et que l'inhibition de cette voie atténuait la mort cellulaire.³⁶

Il a été également montré que les niveaux d'ARNm de TNF- α , IL-1 β et MCP-1 étaient régulés positivement dès une heure après l'induction expérimentale d'un DR, ce qui suggère que ces cytokines pourraient contribuer activement à la physiopathologie du DR.^{18,37} Comme précédemment décrit, le TNF- α peut induire la mort des photorécepteurs par activation de caspase-8 et de RIP kinase. Cependant, il a été également démontré que le blocage du TNF- α supprime l'infiltration rétinienne de macrophages et de cellules microgliales.^{11,13} Par conséquent, TNF- α pourrait être impliqué dans la perte des photorécepteurs dans le DR par l'intermédiaire de signaux pro-apoptotiques et pro-inflammatoires.

Un autre étude a montré qu'une déficience génétique modifiant MCP-1 réduisait considérablement le recrutement de macrophages/microglie et atténuait la perte en photorécepteurs dans un modèle de DR.¹⁴ Dans des cultures rétiniennes, l'ajout de MCP-1 induit une perte des photorécepteurs, toutefois cet effet a été aboli par l'élimination des macrophages/microglie CD11b positifs de ces cultures rétiniennes.¹⁴ MCP-1 intervient donc indirectement dans la mort des photorécepteurs via l'activation et le recrutement de macrophages/microglie.

1.2.2.6 Stress du réticulum endoplasmique et mort cellulaire

En réponse au stress, une perturbation de l'homéostasie du réticulum endoplasmique, souvent appelée « stress du réticulum endoplasmique », survient dans la cellule et entraîne une accumulation de protéines non pliées (*unfolded proteins*). Il s'agit, initialement, d'un mécanisme d'autoprotection, mais un stress prolongé ou excessif peut conduire à la mort cellulaire.^{15,38} Il a été montré que l'expression de GRP78 (*glucose-regulated protein 78*) et GADD153 (*growth arrest DNA damage-inducible gene 153*)/CHOP (*CPEBP homologous protein*), deux marqueurs de stress du réticulum endoplasmique, était augmentée dans un modèle de DR chez le rat. L'élévation de GADD153 était associée à la mort des

photorécepteurs, ce qui suggère que le stress du réticulum endoplasmique pourrait être une des voies impliquées dans la mort cellulaire dans le DR.^{15,16}

En conclusion, les mécanismes de mort cellulaires survenant au cours du DR sont multiples et complexes. Il est possible que les différents mécanismes surviennent de façon séquentielle et dépendent de facteurs endogènes, génétiques ou épigénétiques par exemple, qui pourraient influencer sur la réponse endogène au stress oxydatif ou à l'inflammation. Bien que la plupart des travaux aient porté sur la mort des photorécepteurs, il est aussi important d'étudier la mort cellulaire dans d'autres types cellulaires et en particulier dans les cellules EPR et les cellules gliales de Müller, toutes deux cruciales à la restauration d'un état homéostatique après la chirurgie du DR. Finalement, les modèles animaux de DR sont induit par l'injection d'un produit visqueux ou de substances qui permettent de maintenir la rétine décollée pendant plusieurs jours, mais ils ne récapitulent pas tous les mécanismes du DR chez l'homme et en particulier ne tiennent pas compte de la nature du liquide sous-rétinien, qui pourraient jouer un rôle non négligeable dans les mécanismes de mort des photorécepteurs et des cellules ERP.

1.2.3 Neuroprotection et décollement de rétine

1.2.3.1 Neuroprotection : définition

La neuroprotection est la capacité d'une thérapie à prévenir la mort des cellules neuronales en intervenant dans la cascade pathogénique qui entraîne un dysfonctionnement cellulaire et la mort éventuelle. Cependant, le concept de neuroprotection peut impliquer non seulement la prévention de la mort cellulaire mais aussi la restauration de la fonction neuronale et du nombre de neurones endommagés. La mise au point des thérapies destinées à ralentir ou à prévenir la progression des maladies neurodégénératives devrait ainsi résulter d'une meilleure compréhension de l'étiologie et de la physiopathologie de ces maladies.³⁹

1.2.3.2 Intérêt de la neuroprotection dans le décollement de rétine

La chirurgie vitréo-rétinienne moderne permet la ré-application de la rétine et une guérison anatomique dans environ 90% des cas.^{3,40} Cependant, la récupération de la fonction visuelle est souvent partielle en raison de la mort des photorécepteurs, qui reste la cause principale de perte visuelle lors d'un DR.³⁵ La récupération fonctionnelle après DR atteignant la macula est variable selon les séries, mais environ 50% des patients auront une acuité visuelle inférieure à 20/50.^{41,42} Les différences dans les séries peuvent être expliquées par l'hétérogénéité des patients inclus dans les différentes études. En effet, plusieurs facteurs interviennent dans la récupération fonctionnelle post-chirurgicale, tels que la durée du DR,^{43,44} l'acuité visuelle pré-opératoire,^{41,45-47} la hauteur du soulèvement maculaire^{48,49} et les altérations structurales des couches rétinienne externes révélées par tomographie en cohérence optique (œdème, ondulation, kystes).⁴⁸⁻⁵⁰ De plus, il a été montré qu'en post-opératoire l'altération et l'amincissement des segments externes des photorécepteurs sont les principales altérations structurales responsable d'une moindre récupération visuelle.^{48,51} Tout ces facteurs expliquent que la protection des photorécepteurs avant, pendant et après l'intervention chirurgicale est essentielle pour améliorer la récupération fonctionnelle dans le DR, d'où l'intérêt d'identifier des molécules neuroprotectrices adjuvantes à la chirurgie.

1.2.3.3 Thérapies neuroprotectrices dans des modèles animaux de décollement de rétine

Plusieurs molécules agissant sur les différents types et voies de mort cellulaire décrites ci-dessus ont été explorées au niveau fondamental, dans le but de réduire la perte des photorécepteurs.³⁵

Parmi les molécules capables d'inhiber l'apoptose on retrouve : (Figure 15)

- Celles pouvant inhiber la voie extrinsèque : Met12 et Faim2 (*Fas apoptotic inhibitory molecule 2*).

L'inhibition du complexe ligand Fas/récepteur a été évalué avec Met12, un petit inhibiteur peptidique du récepteur Fas. Lorsque ce peptide était injecté en sous-rétinien ou en intravitréen chez le rat, au moment de l'induction du DR, l'apoptose des photorécepteurs était réduite et la couche nucléaire externe était significativement plus épaisse chez les animaux traités.

Faim2 est également un inhibiteur de la voie de signalisation de Fas. Lorsque les niveaux de Faim2 ont été réduits dans une lignée cellulaire de cônes, l'activation du récepteur Fas a entraîné une augmentation de la mort cellulaire, indiquant que Faim2 pourrait prévenir la mort des photorécepteurs lors d'un DR.

- Celles pouvant inhiber la voie intrinsèque : tels que l'acide tauroursodésoxycholique (TUDCA). TUDCA administré en intrapéritonéal pendant 3 jours à la dose de 500mg/kg a montré une diminution des cellules TUNEL positives et de l'activité des caspases 9 et 3 dans un modèle de DR chez le rat.⁵²

- Celles pouvant agir sur l'activité des caspases au niveau des deux voies, extrinsèque et intrinsèque, ou au niveau des caspases effectrices : le Resveratrol, un anti-oxydant, et la Minocycline, un antibiotique.

Le Resveratrol administré en intrapéritonéal pendant 3 jours à la dose de 20 mg/kg a entraîné une diminution des cellules TUNEL positives et de l'activité des caspases 8, 9 et 3, dans un modèle de DR chez le rat.⁵³

Des injections quotidiennes de Minocycline à la dose de 50 mg/kg ont entraîné une diminution du nombre de cellules TUNEL et caspase-3 positives jusqu'à 3 jours après DR.⁵⁴ La Minocycline agit par ailleurs sur le recrutement de cellules microgliales,

suggérant qu'une inhibition de l'inflammation cellulaire joue un rôle bénéfique sur la protection de photorécepteurs.⁵⁵

- Celles pouvant inhiber l'apoptose caspase-dépendante et caspase-indépendante : tels que Nelfinavir et Ritonavir, qui empêchent l'ouverture des pores PTPC au niveau de la membrane mitochondriale et sa perméabilisation (MOMP). Ils ont conduit à une réduction de l'apoptose des photorécepteurs par inhibition de la translocation de l'AIF de la mitochondrie vers le noyau, à l'inhibition de la libération de cytochrome C, et par conséquent à l'activation de caspases 9, dans un modèle de DR chez la souris.²²
- Celles pouvant inhiber l'apoptose caspase-indépendante : comme la protéine de choc thermique 70 qui peut interagir avec AIF et empêcher sa translocation vers le noyau.³⁵
- Celles pouvant inhiber le stress du réticulum endoplasmique : GADD 153 shRNA, qui a permis de prévenir la mort cellulaire des photorécepteurs, et a conduit à une augmentation de l'épaisseur de la couche nucléaire externe dans un modèle expérimental de DR chez le rat.¹⁶

D'autres molécules agissent au niveau d'autres types de mort cellulaire, tels que :

- La Necrostatine-1, qui prévient la nécrose cellulaire par inhibition de RIP kinase. Il a été montré que la Necrostatine-1 diminue la mort cellulaire par nécrose et améliore la récupération fonctionnelle mesurée par électrorétinographie dans un modèle de DR chez le rongeur.²⁶
- La Rapamycine, qui peut inhiber la nécrose des photorécepteurs par inhibition de l'expression de RIP kinase et activer l'autophagie par induction de becline-1 et LC3 dans un modèle de DR chez le rat.⁵⁶ La Rapamycine a entraîné dans le même modèle une inhibition de la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) et de la libération d'AIF.

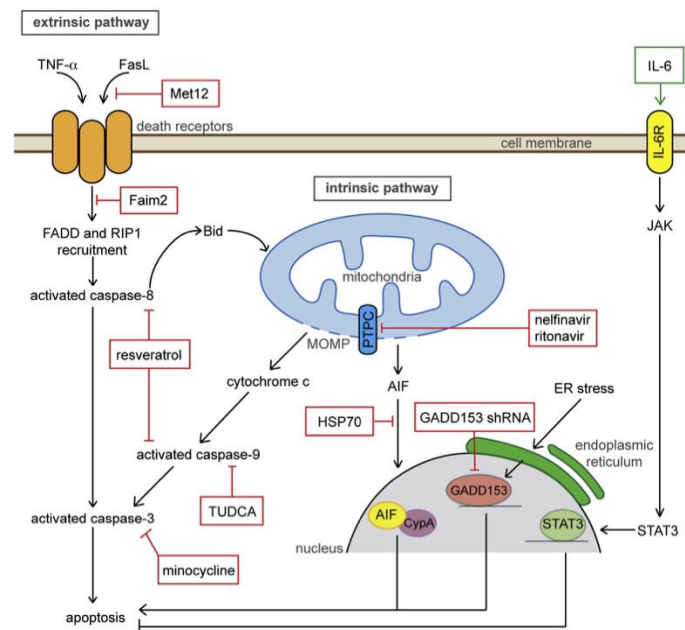
- Le *X-Linked Inhibitor of Apoptosis* (XIAP) : capable d'inhiber l'apoptose (par inhibition des caspases 3, 7 et 9)⁵⁷ et la nécrose (par inhibition de RIP3).⁵⁸ Le XIAP administré sous forme de thérapie génique virale (*adeno-associated virus*, AVV-XIAP), a permis une préservation histologique des photorécepteurs par rapport aux animaux contrôles (traités par l'AAV-GFP) dans un modèle de DR chez le chat, à 9 semaines post-traitement.⁵⁷
- L'Edaravone, qui a montré, après DR expérimental chez le rat, une réduction du nombre de photorécepteurs TUNEL-positifs, de la production de ROS et de l'activation des caspases 3, 8 et 9, ainsi qu'une diminution des taux de TNF- α , de MCP-1 et de l'infiltration de macrophages.⁵⁹

Finalement, d'autres molécules se sont avérées neuroprotectrices dans des modèles expérimentaux de DR mais les voies de signalisation et les mécanismes d'action impliqués ont été moins explorés :

- Le *Nerve growth factor* : qui a entraîné une réduction des cellules TUNEL-positives après induction d'un DR chez le rat.⁶⁰
- Le chélateur de Zinc (caEDTA), qui a permis de prévenir l'accumulation de zinc à la suite de l'induction d'un DR chez la souris, et l'activation des metalloprotéases zinc-dépendantes, tels que MMP (*matrix metalloproteinases*)-2 et 9, réduisant ainsi le nombre de cellules TUNEL positives.⁶¹
- ISO-1, un inhibiteur du « *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) », administré par voie systémique, a montré une diminution du nombre de cellules TUNEL-positives dans un modèle de DR chez la souris, sans agir sur l'activité des caspases ni d'AIF.⁶²

Figure 15. Schéma des mécanismes d'apoptose dans le décollement de rétine et molécules expérimentales capables de l'inhiber (encadrées en rouge).

AIF: apoptosis-inducing factor, Bid: BH3 interacting-domain death agonist, CypA: cyclophilin A, ER: réticulum endoplasmique; FADD: Fas-associated death domain; Faim2 : Fas apoptotic inhibitory molecule 2, FasL: Fas ligand, GADD153: growth arrest DNA damage-inducible gene 153; HSP70: heat shock protein 70, JAK: Janus kinase, Met12: Met YLGA 12-mer (YLGA-amino acid sequence motif containing tyrosine, leucine, glycine, and alanine), MOMP: mitochondrial outer membrane permeabilization, PTPC: permeability transition pore complex, RIP: receptor-interacting protein, shRNA: short hairpin RNA, STAT : signal transducer and activator of transcription, TNF: tumor necrosis factor, TUDCA: tauroursodeoxycholic acid.



Source : d'après Wubben TJ et al. *Ophthalmology*. 2016

1.3 Les molécules neuroprotectrices étudiées

1.3.1 La Transferrine : structure, fonction et rôle neuroprotecteur

1.3.1.1 Le rôle du fer

Le fer est un métal de transition qui existe sous deux états d'oxydation principaux, ferreux (Fe²⁺) et ferrique (Fe³⁺), ce qui lui confère sa capacité d'oxydo-réduction, essentiel à la vie. Cependant, un excès de fer peut conduire à la production d'espèces réactives d'oxygène et

devenir toxique.^{63,64} Le fer est nécessaire dans divers processus biologiques importants. Il est utilisé par un grand nombre de protéines et remplit différentes fonctions. Le fer participe à la formation de l'hème contenu dans l'hémoglobine et la myoglobine, essentielles au transport et au stockage de l'oxygène dans l'organisme. Le fer est également indispensable pour la formation des complexes fer-soufre qui assurent des réactions de transfert d'électrons dans un grand nombre de protéines, notamment les cytochromes a, b et c, la cytochrome oxydase de la chaîne respiratoire mitochondriale, et les déshydrogénases, telles que la succinate déshydrogénase, enzyme du cycle de l'acide citrique (Krebs) nécessaire à la production d'adénosine triphosphate (ATP). Le fer participe également comme cofacteur à l'activité de certaines enzymes, telles que la ribonucléoside réductase, indispensable à la synthèse de l'ADN.^{63,64}

Dans le SNC, le fer est nécessaire à la myélogénèse et au maintien de la myéline par les oligodendrocytes, ainsi qu'à la synthèse des neurotransmetteurs (dopamine, noradrénaline et sérotonine).⁶⁵

Dans la rétine, le fer est particulièrement important dans la phototransduction visuelle. Les photorécepteurs renouvellent en permanence leurs segments externes, composés de disques membranaires contenant les pigments visuels (cf Partie 1.1.4.1.). L'homéostasie des photorécepteurs dépend d'enzymes qui utilisent le fer comme cofacteur, notamment la désaturase des acides gras, pour la synthèse des lipides utilisés dans la génération de nouvelles membranes discales.⁶⁶ De plus, le fer est un cofacteur essentiel pour l'enzyme guanylate cyclase, qui synthétise la guanosine monophosphate cyclique (GMPc), le deuxième messager de la cascade de phototransduction.⁶⁷ ERP65, l'isomérohydrolase présente dans l'EPR, chargée de catalyser la conversion de tout-*trans* en 11-*cis* rétinol au cours du cycle visuel, est également une protéine qui dépend du fer pour son activité.⁶⁸ Le fer intervient aussi dans la formation du neurotransmetteur glutamate par l'aconitase cytosolique dans l'ERP.⁶⁹

1.3.1.2 Homéostasie du fer

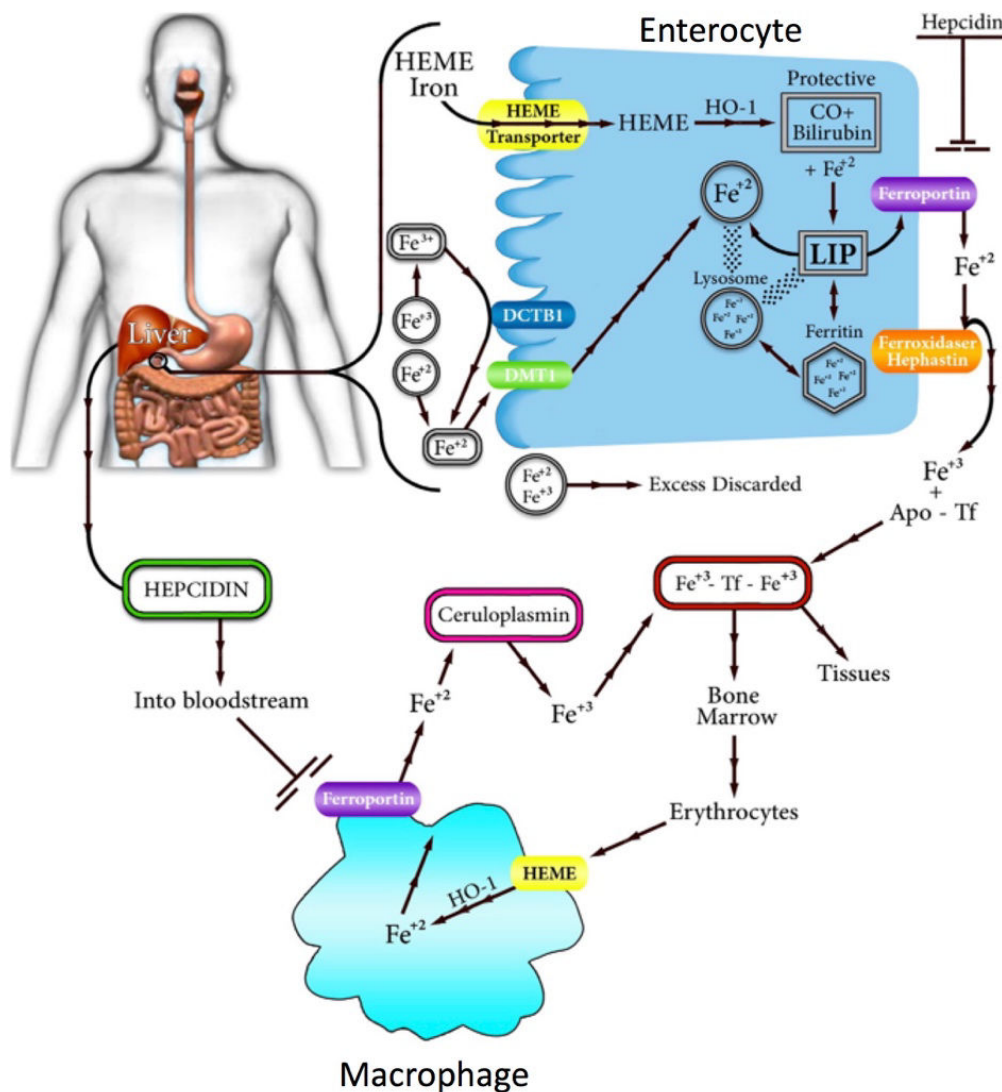
Seulement 10% du fer héminique et non-héminique contenu dans l'alimentation est absorbé au niveau des entérocytes, ce qui compense la quantité de fer perdue par l'organisme (féces, urine et sudation). Les besoins en fer sont ainsi couverts grâce à un métabolisme finement régulé (Figure 16). Le transport du fer élémentaire dans son état ferreux est réalisé par une protéine membranaire, le Divalent Metal Transporter 1 (DMT1). La ferroxidase Dctb1 participe à la conversion du fer ferrique en ferreux pour permettre son absorption. Le fer sous forme d'hème est absorbé par un transporteur spécifique sur la membrane de l'entérocyte. L'hème oxygénase (HO-1) permet la libération du fer de l'hème intracellulaire qui intègre ainsi le pool de fer labile (LIP). Le LIP est accessible pour utilisation dans la cellule et pour être transporté dans la circulation par l'intermédiaire de la ferroportine, une protéine de transport (également appelée MTP-1 ou IREG-1). Le fer est exporté par la ferroportine à l'état ferreux et doit être oxydé pour pouvoir être accepté par l'apo-transferrine en circulation. Cette oxydation est réalisée par l'héphaestine liée à la membrane (ou parfois par la céruplasmine dans la circulation). L'apo-transferrine est une protéine de 80 kDa capable de lier deux molécules de fer ferrique avec une haute affinité, afin de le distribuer aux cellules. En conditions physiologiques, la transferrine est saturée de 30-40% en fer, permettant une capacité de tamponnage importante, et ne laissant que très peu de fer non lié à la transferrine (NTBI) dans la circulation.

En plus du fer absorbé par les entérocytes, une grande partie du fer lié à la transferrine provient des macrophages (également libéré par la ferroportine liée aux membranes), qui recyclent le fer issu de la digestion de l'hémoglobine des érythrocytes abimés ou en fin de cycle, au niveau splénique. Le fer possède ainsi 2 origines, le fer absorbé et libéré par les entérocytes (5%) et le fer recyclé libéré par les macrophages (95%). Lorsque le corps est chargé de fer, le foie produit l'hormone hepcidine. L'hépcidine se lie à la ferroportine sur l'entérocyte ainsi que sur le

macrophage et favorise sa dégradation. Elle est donc un régulateur négatif des taux de fer dans le sang, en empêchant son absorption par l'alimentation et sa libération par les macrophages (Figure 16). La transferrine peut libérer du fer dans toutes les cellules et tissus. Une bonne partie de la transferrine liée au fer est délivrée à la moelle osseuse afin de synthétiser l'hème de l'hémoglobine nécessaire aux érythrocytes.

Figure 16. Métabolisme du fer

DMT1 : Divalent Metal Transporter 1 ; HO-1 : Hème oxygénase LIP : pool de fer labile, Tf : transferrine.

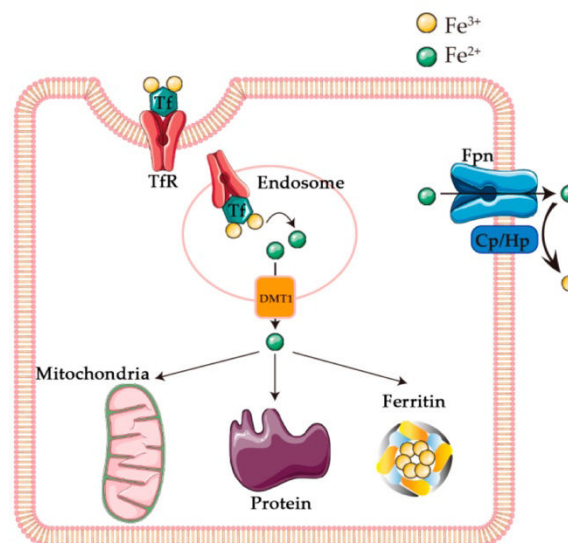


Source : d'après Eid R et al. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2017

L'incorporation du fer dans les cellules (Figure 17) est médiée par l'interaction de la transferrine avec son récepteur de surface (RTF1). Le complexe est internalisé dans des endosomes. Le fer est ensuite libéré pour être utilisé, stocké ou exporté par la cellule. La transferrine liée à son récepteur est recyclée à la surface.⁶⁵ Le fer intracellulaire est stocké par la ferritine, une protéine de 450 kDa constituée de 24 sous-unités polypeptidiques entourant une cavité pouvant contenir jusqu'à 4 500 atomes de fer.⁷⁰ La plupart du fer métaboliquement actif au sein de la cellule est utilisé dans les mitochondries, qui contiennent leur propre ferritine mitochondriale (MtF).⁷⁰ Le fer qui n'est pas utilisé ni stocké peut être exporté par la ferroportine. (Figure 17).

Figure 17. Transport du fer au niveau cellulaire

TfR : récepteur de la transferrine, Fpn : ferroportine, Cp/Hp : céruloplasmine et l'héphaestine



Source : d'après Shu W and Dunaief JL. *Pharmaceutical*. 2018

Dans la rétine, la transferrine est présente dans l'EPR, les segments internes et externes des photorécepteurs et dans la rétine interne.⁷¹ L'expression de l'ARN messenger de la transferrine a été détectée par hybridation in situ dans l'EPR, indiquant qu'il s'agit de son principal site de synthèse. Le récepteur de la transferrine a été détecté par immunohistochimie dans la couche

des cellules ganglionnaires, la couche nucléaire interne, la couche plexiforme externe, les segments internes des photorécepteurs, l'EPR et la choroïde.⁷¹ Dans l'EPR, les récepteurs de la transferrine sont situés sur les surfaces basolatérales et apicales des cellules, ce qui suggère qu'il pourrait y avoir un flux bidirectionnel de fer (Figure 18).⁶⁵ Le fer lié à la transferrine dans la circulation choroïdienne peut être internalisé par les récepteurs de la transferrine situés sur la surface basolatérale des cellules de l'EPR. Le fer est ensuite transporté par endocytose (ou transcytose) vers les surfaces apicales, et libéré vers la rétine neurosensorielle. Ce complexe fer-transferrine peut ensuite être lié par les récepteurs de la transferrine situés sur les segments internes des photorécepteurs.⁶⁵

La transferrine est également abondamment présente dans le vitré, une partie étant synthétisée localement dans l'œil,⁷² ce qui suggère une autre voie possible d'acheminement du fer vers les cellules rétinienne.

La distribution du fer et de la ferritine a été également caractérisée dans la rétine du rat adulte.⁷¹ Ils sont présents dans les segments internes et externes des photorécepteurs, l'EPR, la choroïde, la couche nucléaire interne et la couche de cellules ganglionnaires.⁷¹ La céruloplasmine et l'héphaestine sont présentes dans toute la rétine, et notamment dans les cellules de Müller.^{65,73} La ferroportine et l'hepcidine sont exprimées dans les cellules de Müller, les photorécepteurs, et l'EPR.^{65,74}

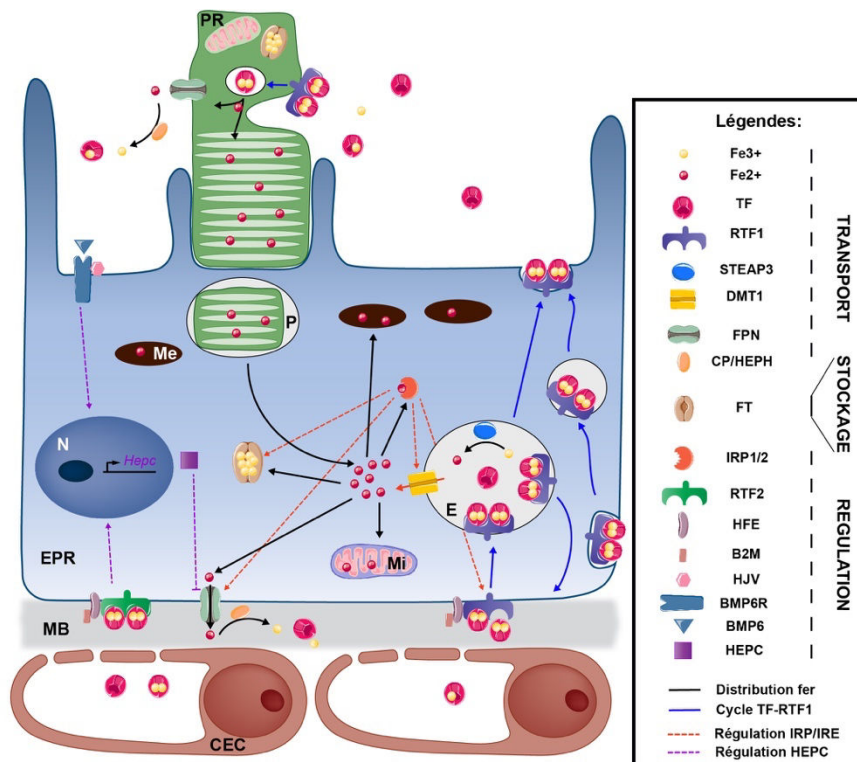
Des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle permettent aux cellules de réguler l'absorption, le stockage et l'exportation du fer en fonction de leur statut en fer (Figure 18). Les IRP (*Iron-regulatory proteins*) 1 et 2 détectent le statut en fer intracellulaire et, en cas de carence, se lient aux IRE (*iron-responsive elements*) sur l'ARN messager des protéines de l'homéostasie du fer telles que la ferroportine, le RTF1, la ferritine et DMT1.⁶⁵ Par ailleurs, la transcription de l'hepcidine est un autre mécanisme permettant la régulation du fer intracellulaire. Elle peut être déclenchée, par exemple, par un taux de saturation de la

Figure 18. Transport, stockage et régulation du fer dans le complexe photorécepteurs-épithélium pigmentaire de la rétine

Le fer Fe^{3+} lié à la transferrine (TF) est capté par son récepteur 1 (RTF1) au niveau basolatéral de l'épithélium pigmentaire de la rétine (EPR). Le complexe TF/RTF1 internalisé est transité au pôle apical ou bien conduit à l'endosome (flèches bleues). Fe^{3+} y est libéré et réduit par la métallo-réductase STEAP3 en Fe^{2+} puis exporté dans le cytosol par le transporteur DMT1 où il constitue au pool de fer libre. Le fer est ensuite acheminé aux organelles en fonction des besoins, soit stocké dans la ferritine (FT) et les mélanosomes (Me), soit exporté par la ferroportine (FPN) couplée à la ferroxidase céruloplasmine (CP) ou l'héphaestine (HEPH) (flèches noires). La quantité de fer intracellulaire est régulée principalement par deux mécanismes. Dans la cellule, le fer se lie à IRP1/2 (*iron regulatory protein*) qui se fixe sur des séquences régulatrices (*Iron responsive element*) des ARN messager pour moduler l'expression de DMT1, RTF1, FT et FPN (flèches oranges). La synthèse de l'hépcidine (HEPC) est activée soit par la liaison de BMP6 (*Bone morphogenetic protein*) avec ses récepteurs couplés à l'hémojuvéline (HJV), soit de la liaison de la TF (en condition de saturation en fer) avec son récepteur 2 (RTF2) couplé à la protéine de l'hémochromatose (HFE) et la Béta-2 microglobuline (B2M) (flèches violettes). L'HEPC interagit avec la FPN et provoque sa dégradation.

La phototransduction opérée au niveau des segments externes des photorécepteurs (PR) est un processus fortement dépendant du fer. Par la phagocytose des segments externes des PR, l'EPR recycle le fer qui rejoint le pool de fer libre. Les PR contrôlent leur apport en fer via RTF1 et FPN présents au niveau des segments internes des PR.

CEC : cellule endothéliale choroïdienne ; E : endosome ; EPR : épithélium pigmentaire de la rétine ; MB : membrane de Bruch ; Me : mélanosome ; MI : mitochondrie ; N : noyaux ; P : phagosome ; PR : photorécepteur.



Source : d'après Courtois Y et al. *Revue médecine/sciences INSERM*.2020 (in press)

transferrine élevé, ce qui permet de retenir le fer dans les cellules. L'HIF intervient également comme un facteur de transcription de certains gènes de l'homéostasie du fer (transferrine, DMT1, ferroportine, céruloplasmine) en se fixant à un site spécifique Hypoxia-responsive element (HRE) présent sur leurs ARN messenger.

1.3.1.3 L'excès de fer, le stress oxydant et les maladies rétinienne

Bien que nécessaire à la fonction rétinienne, le fer en excès dépasse les capacités de tamponnage de la transferrine et de la ferritine, devenant libre (non lié) et donc toxique. Le Fe^{2+} libre participe à la réaction de Fenton en catalysant la conversion du peroxyde d'hydrogène en radical hydroxyle ($HO\bullet$), la plus réactive des espèces réactives de l'oxygène. Le Fe^{3+} peut être réduit en Fe^{2+} en réagissant avec l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) (Réaction de Haber-Weiss).^{64,75} Les radicaux hydroxyles sont extrêmement réactifs, provoquant une peroxydation lipidique, des ruptures de brins d'ADN et une dégradation des biomolécules.^{64,76} Le couple Fe^{2+}/Fe^{3+} agit également directement sur les lipides entraînant une peroxydation. La ferroptose désigne ainsi un nouveau type de mort cellulaire programmée induite par le fer et dépendant des espèces réactives de l'oxygène (Annexe 1).⁷⁷ Les modifications cellulaires observées la distinguent de l'apoptose, la nécrose et l'autophagie. Il existe notamment une diminution de la taille mitochondriale, avec diminution de la crête mitochondriale et rupture de la membrane mitochondriale externe. Ces anomalies cellulaires résultent d'une perte de perméabilité sélective de la membrane plasmique due à une peroxydation lipidique intense et à la survenue d'un stress oxydant.⁷⁷

Il a été montré que des souris ayant reçu des injections intra-vitréennes de $FeSO_4$ ont présenté une augmentation des radicaux superoxyde dans les segments internes, et une peroxydation lipidique des photorécepteurs, entraînant l'apparition de cellules TUNEL-positives dans la

couche nucléaire externe et une dégénérescence rétinienne un jour après injection.⁷⁸ Quatorze jours après l'injection, la couche nucléaire externe montrait une réduction d'épaisseur significative.⁷⁸ Ce processus survient notamment dans la sidérose oculaire secondaire à un corps étranger intraoculaire ou à une hémorragie.

Une perturbation entre la rétine neurosensorielle et l'EPR peut entraîner une surcharge en fer. Chez des rats porteurs d'une mutation du gène du récepteur de la tyrosine kinase, Mertk, l'EPR ne peut pas phagocyter les segments externes des photorécepteurs, ce qui conduit à une accumulation de débris non digérés dans l'espace sous-rétinien.⁷⁹ Ces débris peuvent perturber les interactions normales entre les photorécepteurs et l'EPR, telles que la diffusion de la transferrine. En conséquence, le fer s'accumule dans l'espace sous-rétinien et dans les segments au fur et à mesure que la rétine dégénère et que le taux de transferrine diminue dans les photorécepteurs.⁷⁹

Le fer, via la production de radicaux hydroxyles, a été également impliqué dans la mort des photorécepteurs induite par la lumière.⁸⁰ Dans des modèles de dégénérescence rétinienne induite par la lumière chez la souris, il a été démontré une corrélation entre les modifications de l'expression des gènes du métabolisme du fer, les taux de ferritine et le vieillissement.^{81,82}

Plusieurs études⁶⁵ suggèrent qu'un métabolisme anormal du fer peut favoriser une dégénérescence rétinienne. Ce processus survient notamment dans la sidérose oculaire secondaire à un corps étranger intraoculaire ou à une hémorragie, et dans des maladies héréditaires entraînant une surcharge en fer, notamment l'acéruoplasminémie, l'hémochromatose, la maladie de Hallervorden-Spatz et l'ataxie de Friedreich. La surcharge en fer pourrait également jouer un rôle dans la pathogenèse de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).⁸³ En effet, avec l'âge il existe une accumulation de fer dans les mélanosomes de l'EPR qui favorise la formation de radicaux libres.⁸⁴ Plusieurs études ont montré que

l'accumulation de fer dans l'EPR est impliquée dans les dépôts de complément,⁸⁵ l'inflammation,⁸⁶ la diminution des transporteurs de lipides,⁸⁴ l'angiogenèse⁸⁷ et la ferroptose.⁸⁸ Il a été montré que le fer administré en systémique chez le rat induit des changements similaires à ceux observés lors d'une DMLA,^{89,90} notamment l'épaississement de la membrane de Bruch avec dépôts du complément C3, ainsi que l'hypertrophie et la vacuolisation de l'EPR et des photorécepteurs.⁹⁰ Chez les rats traités au fer, il existait également des taux élevés de fer dans l'EPR et la membrane de Bruch,⁸³ une augmentation de l'expression de ferritine et de transferrine, et une diminution de l'expression du récepteur de la transferrine (TR-1).⁸⁹ L'augmentation de l'expression de la transferrine a également été montrée par réaction en chaîne par polymérase (PCR) et *western-blotting* (WB) dans des rétines post mortem de patients atteints de DMLA.⁹¹ Par ailleurs, il est intéressant de signaler qu'un polymorphisme 576G>A du gène de la transferrine est associé à un risque accru de DMLA chez les fumeurs.⁹²

1.3.1.4 Les chélateurs du fer

Les agents chélateurs du fer pourraient être utiles dans le traitement ou la prévention de maladies rétinienne associées à une surcharge en fer (Tableau 1).⁹³

Les chélateurs du fer, tels que la Déféroxamine, le Déférasirox, et le Défériprone, sont utilisés dans le traitement de patients présentant une surcharge systémique de fer, par exemple dans le cadre d'une thalassémie majeure ou d'une hémochromatose (Tableau 1).⁹³

- La Déféroxamine a été le premier chélateur de fer approuvé pour le traitement de l'intoxication aiguë au fer et de la surcharge en fer chronique chez les patients souffrant d'anémies liées à une transfusion. Cette molécule lie le fer dans un rapport de 1:1, mais présente de nombreuses limitations (Tableau 1). En tant que chélateur de fer hydrophile, elle doit être administrée par perfusion lente sous-cutanée, intramusculaire ou

intraveineuse. Sa demi-vie plasmatique étant courte, une injection continue est souvent nécessaire chez les patients présentant une surcharge en fer. Ce traitement est donc coûteux et inefficace pour les patients nécessitant un traitement chronique. Les effets secondaires les plus courants de la Déféroxamine sont des réactions cutanées et des infections (Tableau1).⁹³ De nombreux effets secondaires au niveau cardiovasculaire, pulmonaire et auditif ont été rapportés.⁹⁴ Des effets secondaires au niveau oculaire ont également été décrits, notamment des anomalies du champ visuel, une diminution de l'acuité visuelle, des défauts de vision des couleurs et une diminution des réponses à l'électrorétinogramme et l'électro-oculogramme, faisant de cette molécule un mauvais candidat pour traiter les maladies oculaires liées au fer.⁹⁵⁻⁹⁸ La toxicité rétinienne de la Déféroxamine pourrait résulter de sa forte affinité pour le fer, entraînant une carence rétinienne en fer.

- Le Déférasirox lie le fer dans un rapport de 2:1. Il est administré par voie orale et sa longue demi-vie permet une administration une fois par jour (Tableau1). En raison de son poids moléculaire relativement faible, il est mieux absorbé et deux fois plus puissant que la Déféroxamine pour mobiliser le fer à partir des tissus. Les effets indésirables les plus fréquents sont les douleurs abdominales, les troubles gastro-intestinaux, les vomissements et les éruptions cutanées transitoires.⁹⁹⁻¹⁰¹ Des doses plus élevées peuvent causer des toxicités hépatiques, rénales¹⁰² et oculaires, notamment des rétinopathies¹⁰³ et des opacités du cristallin.¹⁰⁴
- La Défériprone lie le fer dans un rapport de 3:1 et nécessite une administration orale trois fois par jour.⁹³ Les effets secondaires peuvent inclure une augmentation des enzymes hépatiques, des troubles gastro-intestinaux ou des arthralgies.^{105,106} Les effets indésirables les plus graves sont l'agranulocytose et la neutropénie (Tableau1).^{107,108} Il a été montré que la Défériprone orale protège contre la dégénérescence rétinienne

induite par la surcharge en fer chez les souris *knock-out* pour l'hepcidine¹⁰⁹ et dans les souris double *knock-out* pour la céruloplasmine et l'héphaestine,¹¹⁰ deux modèles d'accumulation rétinienne de fer liée à l'âge. Cependant, des effets adverses au niveau oculaire, tels que des opacifications cristalliniennes et des altérations de l'épithélium pigmentaire, ont été rapportés avec l'utilisation de la Défériprone chez des patients transfusés dans le cadre d'une thalassémie majeure.^{111,112}

Par ailleurs, tous ces chélateurs chimiques sont anémiant et il n'est pas possible de dépléter le fer spécifiquement là où il est en excès.

- La transferrine est le chélateur physiologique endogène du fer (Tableau 1). Elle est la protéine la plus abondante dans le vitré après l'albumine. Des effets délétères n'ont jamais été rapportés, même après injections intravitréennes chez les rongeurs.⁸² Une souris transgénique, qui surexprime la transferrine humaine, n'a pas présenté d'anomalies oculaires ou systémiques.¹¹³ Après l'injection intravitréenne, la transferrine diffuse rapidement dans la rétine et s'accumule dans les photorécepteurs et l'EPR avant d'atteindre la circulation sanguine, avec une demi-vie de 4 à 8 jours.⁸² Elle peut être éliminée par l'EPR à travers les récepteurs spécifiques de la transferrine. En plus, l'effet chélateur de la transferrine ne représente pas un risque de carence en fer car les récepteurs de la transferrine peuvent être régulés par la cellule selon son statut en fer. En raison de toutes ces propriétés, la transferrine semble être une molécule candidate idéale à explorer pour le traitement des maladies rétinienne où intervient une surcharge en fer.

Tableau 1. Caractéristiques comparées des principaux chélateurs du fer utilisés en clinique, et de la transferrine

	Déféroxamine	Défériprone	Déférasirox	Transferrine
Liaison au Fer	1:1	3:1	2:1	2:1
Voie d'administration	SC/IV	Oral (3×/jour)	Oral (1×/jour)	IV
Demi-vie	20-30 minutes	3-4 heures	8-16 heures	4-8 jours
Élimination	Urinaire/Fécale	Urinaire	Fécale	Non connu
Utilisation en clinique	Intoxication aiguë Surcharge chronique en fer	Surcharge chronique en fer	Surcharge chronique en fer	Atransferrinémie ¹⁴
Effets secondaires systémiques	Cutanés ⁹³ Cardiovasculaires ⁹⁴ Pulmonaires ¹¹⁵ Gastrointestinaux ¹¹⁶ Osseux ¹¹⁷ Auditifs ⁴⁰⁻⁴²	Gastrointestinaux ¹⁰⁵ Articulaires ¹⁰⁵ Neurologiques ¹¹⁸ Hépatiques ¹⁰⁶ Hématologiques ^{107,108}	Gastrointestinaux ⁹⁹ Cutanés ¹⁰⁰ Hépatiques ^{101,102} Rénales ^{101,102}	Non rapportés
Effets secondaires oculaires	Rétinopathie pigmentaire ⁹⁶ Perte visuelle ⁹⁷ Hemeralopie ¹¹⁹ Névrite optique ⁹⁶ Cataracte ⁹⁸	Retinopathie ^{120,121} Diplopie ¹¹⁸ Cataracte ¹¹²	Rétinopathie ¹⁰³ Cataracte ¹⁰⁴	Non rapportés

SC= sous-cutané ; IV= intraveineux

1.3.1.5 Le rôle neuroprotecteur de la transferrine

Le rôle neuroprotecteur de la transferrine a été étudié dans différents modèles animaux de dégénérescence rétinienne.^{82,113} Picard *et al.*¹²² (équipe INSERM UMR1138) ont montré le rôle neuroprotecteur de l'apo-transferrine humaine sur des cultures de cellules gliales de Müller exposées au fer. Ce rôle a été démontré dans deux conditions différentes : 1) sur des cellules gliales de Müller provenant d'une souris transgénique exprimant la transferrine humaine ; 2) sur des cellules gliales de Müller provenant de souris *wild type* après addition de transferrine humaine au milieu de culture. Une augmentation de la survie cellulaire et une diminution de la libération de lactate déshydrogénase (LDH), un marqueur de nécrose, dans le milieu de culture ont été constatées en présence d'apo-transferrine humaine. En revanche, la holo-transferrine humaine (transferrine saturée en fer) ne possédait pas les effets neuroprotecteurs de l'apo-transferrine (transferrine non saturée en fer) dans les mêmes conditions. Les auteurs concluaient que les effets neuroprotecteurs de l'apo-transferrine sont liés à ses propriétés en tant que chélateur du fer.¹²² Dans une autre étude par la même équipe,¹¹³ il a été constaté chez des souris rd10, modèle de rétinopathie pigmentaire, que la dégénérescence des photorécepteurs s'accompagnait d'une accumulation de fer au niveau de l'EPR et de la rétine externe. L'injection intrapéritoneale de transferrine humaine ou la surexpression par modification génétique des souris rd10, augmentait de 60% la survie des cônes et bâtonnets, par rapport au groupe non traité et non modifié génétiquement.¹¹³ Plus récemment, le même groupe a démontré l'efficacité de l'apotransferrine humaine administrée par injection intravitréenne ou produite par transfection d'un plasmide codant pour la protéine dans un modèle de dégénérescence induit par la lumière chez le rat et le modèle P23H.⁸² Le traitement par apo-transferrine a permis une préservation histologique et fonctionnelle de la rétine, démontré par une conservation de l'épaisseur de la couche nucléaire externe, une diminution de l'apoptose (cellules TUNEL-positives), une augmentation de la survie cellulaire en immuno-marquage et

une préservation des ondes a et b à l'électrorétinogramme. La transferrine a également induit une diminution des marqueurs de stress oxydant et d'inflammation, ainsi que de l'activation des macrophages/microglie.⁸²

Bien que le traitement par transferrine a permis une réduction de l'apoptose, de l'inflammation et du stress oxydatif,^{82,113} les médiateurs moléculaires et les voies impliquées dans les effets protecteurs de la transferrine n'ont pas été étudiés en profondeur.

Il a été montré sur des cellules rétinienne neurales en culture que l'ovo-transferrine favorisait la survie et la croissance cellulaire, même devant une concentration toxique en fer.¹²³ Les auteurs ont conclu que les effets neurotrophiques de la transferrine ne reposaient pas seulement sur sa capacité de transport du fer, suggérant que d'autres mécanismes devraient être explorés.¹²³ Le rôle de la transferrine en tant que neurotransmetteur a été exploré dans des cellules rétinienne de poulet en culture.¹²⁴ Une brève exposition à la transferrine a entraîné une augmentation spectaculaire et transitoire des taux de calcium intracellulaire dans environ 20% de la population totale de cellules rétinienne en culture. Une étude des réponses électrophysiologiques des cellules bipolaires a montré que dans plus de la moitié de ces cellules, l'application de transferrine entraînait une dépolarisation membranaire transitoire. De plus, les courants évoqués après application de transferrine étaient similaires à ceux du glutamate. Les auteurs ont conclu que la transferrine pourrait avoir une fonction de neurotransmetteur ou neuromodulateur.¹²⁴ Il est intéressant de signaler que les concentrations de transferrine sont augmentées pendant la maturation des photorécepteurs dans la rétine de poulet embryonnaire, ce qui suggère une implication de la transferrine dans le développement et la maturation rétinienne.^{125,126}

1.3.2 Les acides biliaires : Structure, fonction et rôle neuroprotecteur

1.3.3 Article 1. Review : *The bile acids ursodeoxycholic acid and tauroursodeoxycholic acid as neuroprotective therapies in retinal disease*

(Molecular Vision, 2019)

Les acides biliaires sont produits par le foie et excrétés dans l'intestin, où leurs principales fonctions sont l'émulsification, l'absorption et la digestion des lipides. Ils jouent un rôle secondaire comme stéroïdes modulant divers processus métaboliques, tels que le métabolisme du glucose hépatique et la modulation de la survie des cellules hépatiques.¹²⁷

La médecine asiatique ancestrale recommandait l'utilisation de la bile de vertébrés et d'invertébrés pour le traitement des troubles visuels.¹²⁸ Depuis plus de 10 ans, de nombreuses études ont confirmé que les acides biliaires hydrophiles, l'acide ursodésoxycholique (UDCA) et l'acide tauroursodéoxycholique (TUDCA), exercent des effets neuroprotecteurs dans plusieurs modèles de maladies dégénératives au niveau du SNC et de la rétine.¹²⁹ Des effets neuroprotecteurs des acides biliaires ont été montrés dans des modèles de la maladie d'Alzheimer,¹³⁰⁻¹³⁴ de Parkinson¹³⁵⁻¹³⁷ et la maladie de Huntington.¹³⁸ UDCA administré oralement chez des patients présentant une sclérose latérale amyotrophique, a montré une bonne tolérance¹³⁹ et un ralentissement dans la progression de la maladie.^{140,141} Au niveau rétinien, les acides biliaires ont montré des effets protecteurs dans plusieurs modèles de dégénération des photorécepteurs^{52,128,142-148} et des cellules ganglionnaires,¹⁴⁹⁻¹⁵² ainsi que dans des modèles de rétinopathie diabétique.¹⁵³⁻¹⁵⁷ Cependant, il n'existe aucune indication clinique reconnue pour l'utilisation des acides biliaires dans les maladies neurodégénératives. Bien que

des effets anti-apoptotiques, anti-inflammatoires et antioxydants^{52,128,155} aient été démontrés pour ces molécules, les principales voies de signalisation et les mécanismes moléculaires par lesquels les acides biliaires agissent en tant que neuroprotecteurs sont encore mal compris, ce qui retarde leur application clinique.

Nous passerons ici en revue :

- la structure et la fonction des acides biliaires au niveau hépatique et dans la circulation entéro-hépatique
- les principales études montrant un rôle neuroprotecteur des acides biliaires dans les maladies dégénératives du SNC et de la rétine
- les mécanismes d'action et les voies de signalisation impliquées dans les effets cytoprotecteurs des acides biliaires, dans le foie et la circulation entéro-hépatique, le SNC et la rétine

Review: The bile acids urso- and tauroursodeoxycholic acid as neuroprotective therapies in retinal disease

Alejandra Daruich,^{1,2} Emilie Picard,¹ Jeffrey H. Boatright,^{3,4} Francine Behar-Cohen^{1,5}

¹INSERM, UMRS1138, Team 17, From physiopathology of ocular diseases to clinical development, Université Sorbonne Paris Cité, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France; ²Ophthalmology Department, Necker-Enfants Malades University Hospital, AP-HP, Paris, France; ³Department of Ophthalmology, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA; ⁴Center of Excellence, Atlanta Veterans Administration Medical Center, Decatur, GA; ⁵Ophthalmopole, Cochin Hospital, AP-HP, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France

Bile acids are produced in the liver and excreted into the intestine, where their main function is to participate in lipid digestion. Ursodeoxycholic acid (UDCA) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) have shown antiapoptotic, anti-inflammatory, and antioxidant effects in various models of neurodegenerative diseases. However, little is known about signaling pathways and molecular mechanisms through which these bile acids act as neuroprotectors, delaying translation to the clinical setting. We review evidence supporting a potentially therapeutic role for bile acids in retinal disorders, and the mechanisms and pathways involved in the cytoprotective effects of bile acids from the liver and the enterohepatic circulation to the central nervous system and the retina. As secondary bile acids are generated by the microbiota metabolism, bile acids might be a link between neurodegenerative retinal diseases and microbiota.

Bile acids are produced in the liver and excreted into the intestine, where their main function is to participate in the emulsification, absorption, and digestion of lipids. They have a secondary role as a steroid hormone modulating various metabolic processes, such as hepatic glucose metabolism and liver cell survival [1].

Traditional Asian medicine recommended the use of vertebrate and invertebrate bile for patients with visual disorders [2]. For more than 10 years, numerous studies have confirmed that the hydrophilic bile acids, ursodeoxycholic acid (UDCA) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), are protective in diseases affecting the central nervous system and the retina [3]. However, there is no clinical indication for the use of bile acids in neurodegenerative diseases. Although antiapoptotic, anti-inflammatory, and antioxidant effects have been shown for these molecules, little is known about primary signaling pathways and molecular mechanisms through which bile acids act as neuroprotectants, delaying translation to the clinical setting. We review evidence supporting a potentially therapeutic role for bile acids in retinal disorders, and the mechanisms and pathways involved

in the cytoprotective effects of bile acids from the liver and the enterohepatic circulation to the central nervous system and the retina.

The bile acids: Chemical structure and physiology: Bile acids are the major constituents of human bile [1]. They have a 24-carbon structure containing 5 β -steroids, and their main role is the emulsification of lipids, a fundamental step for lipid absorption and digestion [4]. Primary bile acids, cholic acid (CA) and chenodeoxycholic acid (CDCA), are synthesized from cholesterol in the liver (Figure 1) via two main pathways, the classical and alternative pathways. The classical pathway is initiated by cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1), which is regulated by the farnesoid X receptor (FXR). The alternative pathway can be initiated by different enzymes that are also expressed outside the liver [1].

Bile acids are transported from the hepatocytes through the bile canaliculi and stored in the gallbladder. Following food intake, the presence of fats and proteins in the stomach results in the release of bile acids from the gallbladder into the duodenum. In the intestine, gut microbiota produces the secondary bile acids by modification of the primary bile acids, via 7 α -dehydroxylation, deconjugation, and oxidation or epimerization of the hydroxyl groups at C-3, C-7, and C-12 (Figure 1). The secondary bile acids deoxycholic acid (DCA) and lithocholic acid (LCA) are formed by dehydroxylation of CA and CDCA, respectively, performed by dehydratases of the anaerobic flora from the human colon. Epimerization of hydroxyl groups of CDCA by the hydroxysteroid

Correspondence to: Francine Behar-Cohen, INSERM, UMRS1138, Team 17, From physiopathology of ocular diseases to clinical development, Université Sorbonne Paris Cité, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France. Phone : +33 (1)44.27.81.64; FAX :+33 (1) 44.27.81.77; email: francine.behar@gmail.com

dehydrogenases of intestinal bacteria leads to the formation of UDCA.

Bile acids are secreted as conjugated molecules with glycine or taurine, forming the bile salts, such as TUDCA, the taurine conjugate of UDCA. Bile acids are then redirected to the liver via the portal vein (enterohepatic circulation, Figure 1). Ninety-five percent of the unconjugated bile acids are reabsorbed into intestinal enterocytes by passive diffusion in the jejunum and colon, while conjugated bile acids are actively taken up in the ileum mainly via the apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) [5]. The remaining 5% of the unconjugated bile acids are excreted via feces. Most bile acids absorbed by the enterocytes and released into the portal vein are redirected to the liver for recycling. The main bile acid transporters are summarized in Table 1. Less than 10% of bile acid reaches the systemic circulation [6]. Bile

acids has been detected in plasma at a concentration range of nanograms per milliliter, as well as in the cerebrospinal fluid [7]. However, bile acid concentrations have not been measured thus far in ocular fluids.

Bile acid signaling occurs through nuclear receptors and cell membrane receptors [8] (Table 1), including the FXR, the vitamin D receptor (VDR), the pregnane X receptor (PXR), the glucocorticoid receptor (GR) and the mineralocorticoid receptor (MR), the constitutive androstane receptor (CAR), Takeda G protein-coupled receptor 5 (TGR5), the α 5 β 1 integrin, and the sphingosine-1-phosphate receptor 2 (s1PR2). The most studied bile acid receptors are FXR and TGR5. Both receptors are abundantly expressed in the enterohepatic circulation. Bile acids exert negative feedback regulation on their own synthesis mainly through the FXR [9]. Bile acids

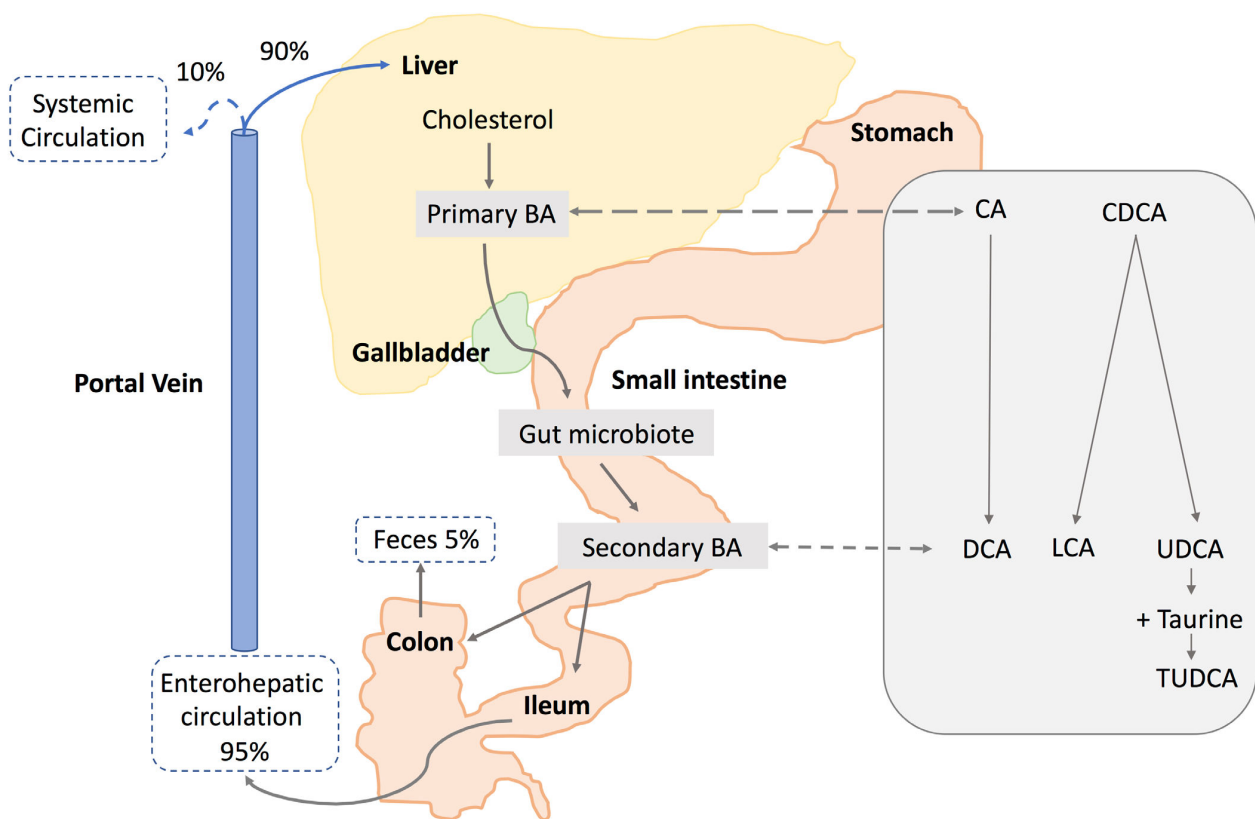


Figure 1. Schematic representation of synthesis and circulation of bile acids. Primary bile acids (BAs), cholic acid (CA), and chenodeoxycholic acid (CDCA) are synthesized in the liver from cholesterol and stored in the gallbladder. Following food intake, bile acids are released into the small intestine. Secondary bile acids are produced by the gut microbiota from modifications of primary bile acids. Deoxycholic acid (DCA) is formed from CA. Lithocholic acid (LCA) and ursodeoxycholic acid (UDCA) are formed by CDCA. Taurine conjugation of UDCA forms tauroursodeoxycholic acid (TUDCA). About 95% of the bile acids are reabsorbed in the ileum, and 5% are lost in feces. The bile acids absorbed by the enterocytes are released into the portal vein and redirected to the liver for recycling (enterohepatic circulation). Only a small portion (10%) escapes the enterohepatic circulation and reaches the systemic circulation.

TABLE 1. RECEPTORS AND TRANSPORTERS FOR BILE ACIDS.

Membrane receptors	Bile acid affinity	Location
Takeda G-protein coupled receptor 5 (TGR5)	LCA, DCA, CDCA, CA, TUDCA	Liver, intestine, brain, eye (primary retinal ganglion cells) spleen, lung, monocytes
Sphingosine 1-phosphate receptor 2 (S1PR2)	TCA, GCA, TDCA, GDCA, TUDCA	liver, brain, eye (rat bipolar retinal cells, mouse retinal endothelial cells) heart, lung
$\alpha 5\beta 1$ Ivr $\epsilon 7$ piv	TUDCA	Liver, brain, retina (human vessels, astrocytes)
Nuclear receptors		
Farnesoid X receptor (FXR)	LCA, DCA, CDCA, CA	Liver, intestine, brain
Vitamin D receptor (VDR)	LCA	Intestine, liver, bone, kidneys, retina and cells (β cells, adipocytes, vascular smooth muscle cells, monocytes)
Pregnane X receptor (PXR)	LCA	Liver, intestine, brain, retina (RPE cells)
Glucocorticoid receptor (GR) and mineralocorticoid receptor (MR)	UDCA, TCA, GDCA, TUDCA	Liver, brain, retina
Constitutive androstane receptor (CAR)	CA	Liver, brain, kidney, adrenals
Transporters		
Apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT)	Unconjugated and conjugated bile acids	Intestine, cholangiocytes, brain
Sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)	Unconjugated and conjugated bile acids	Liver, brain
Organic anion-transporting polypeptide (OATP)	Unconjugated and conjugated bile acids	Liver, Intestine, brain, retina
Multidrug resistant protein (MRP), 2, 3, 4	TCA, CA and conjugated bile acids	Liver, Brain, retina
Bile salt export pump (BSEP)	Conjugated bile acids	Liver, brain

LCA: lithocholic acid, DCA: deoxycholic acid, CDCA: chenodeoxycholic acid, CA: cholic acid, UDCA: ursodeoxycholic acid, TCA: taurocholic acid, GDCA: glycodeoxycholic acid, TUDCA: tauroursodeoxycholic acid, RPE: retinal pigment epithelium

are also involved in the regulation of various metabolic processes.

Through activation of the FXR and TGR5, bile acids regulate not only their own synthesis and enterohepatic circulation but also triglyceride, cholesterol, glucose, and energy homeostasis [10]. The PXR functions as a xenobiotic sensor that could protect the liver from bile acid toxicity during cholestasis [8]. Activation of PXR increases expression of cytochrome P450s that hydroxylate bile acids to less toxic, more hydrophilic bile acids that are subsequently excreted into the bile [8]. VDR activation participates in bile acid synthesis, conjugation, transport, and metabolism. It also plays a role as an intestine bile acid sensor protecting the gut from bile acid toxicity [8]. $\alpha 5\beta 1$ integrins are the main receptors implicated in the mechanism of action of UDCA during cholestasis. UDCA, which in vivo is converted to its taurine conjugate TUDCA, is a mainstay for the treatment of cholestatic liver disease. It has been shown that TUDCA can directly activate intrahepatocytic $\alpha 5\beta 1$ integrins, which trigger signal transduction pathways (focal adhesion kinase (FAK), src, Erk1/2, and p38) toward choleresis [11]. Finally, activation of S1PR2 in hepatocytes regulates bile acid synthesis and increases glycogen synthesis [8].

Cytoprotective effect of UDCA and TUDCA in the liver: Hydrophobic bile acids within the hepatocyte induce cell death during cholestasis, while hydrophilic bile acids are cytoprotective. UDCA, a hydrophilic bile acid used for the treatment of cholesterol gallstone dissolution, is currently considered the first choice therapy for several forms of cholestatic syndromes [12]. The cytoprotective effects of this molecule result, in part, from its ability to reduce apoptosis [9]. The antiapoptotic effects of UDCA and TUDCA have been demonstrated in rat liver and human hepatocytes. UDCA negatively modulates the mitochondrial pathway by inhibiting Bax translocation, the formation of reactive oxygen species (ROS), cytochrome c release, and caspase-3 activation [9]. Moreover, TUDCA inhibits apoptosis associated with endoplasmic reticulum (ER) stress by modulating intracellular calcium levels and inhibiting calpain and caspase-12 activation [9]. Importantly, nuclear translocation of UDCA mediated by nuclear steroid receptors (NSRs) was shown to be essential for its antiapoptotic properties [13]. UDCA interacts with NSRs, the glucocorticoid receptor (GR), and the mineralocorticoid receptor (MR) to reach the nucleus. Once in the nucleus, UDCA modulates the E2F-1/p53/Bax pathway, thus preventing apoptosis [14].

Neuroprotective effects of UDCA and TUDCA in neurodegenerative disorders: Numerous studies have reported neuroprotective effects of UDCA and TUDCA in various models

of neurodegenerative diseases, including, Alzheimer disease (AD) [15-19], Parkinson disease (PD) [20-22], and Huntington's disease (HD) [23]. In APP/PS1 mice, a murine model of AD, TUDCA prevented amyloid precursor protein processing and amyloid- β deposition [18], and significantly attenuated A β deposition in the brain after the onset of amyloid pathology [15]. In the rotenone model of PD, UDCA exerted antiapoptotic and anti-inflammatory effects [20]. It improved mitochondrial dysfunction and reduced nuclear factor- κ B (NF- κ B) expression and tumor necrosis factor (TNF) alpha levels [20]. Furthermore, UDCA prevented proapoptotic alterations in Bax and Bcl-2, and reduced the activities of caspase 8, 9, and 3. Similarly, TUDCA was neuroprotective in a mouse model of PD through the modulation of JNK activity, which plays a central role in dopaminergic neuronal death, the production of ROS, and the activation of the Akt prosurvival pathway, involving Bad phosphorylation and NF- κ B activation [21]. TUDCA also reduced mitochondrial dysfunction that is characteristic of PD [22]. In a transgenic mouse model of HD, TUDCA improved the locomotor and sensorimotor abilities, together with a reduction in striatal cell apoptosis and intracellular huntingtin inclusion [23].

There are only three clinical studies evaluating the safety and efficacy of bile acids in neurodegenerative disorders, all of them reported in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [24-26]; see Table 2. In a cohort of 18 patients with ALS, oral UDCA showed excellent tolerability and safety, and was accumulated in the cerebrospinal fluid in a dose-dependent manner [24]. In a crossover study, oral UDCA showed a beneficial effect on the rate of functional decline in patients with ALS [25]. More recently, in a double-blind placebo controlled study, oral TUDCA treatment slowed down the progression of ALS disease [26]. Conversely, endogenous bile acid levels appear to be suppressed in patients with neurodegenerative diseases. In patients with AD, plasma concentrations of cholic acid were lower compared with age-matched control subjects. Similarly, the taurocholic acid (TCA) level was significantly lower in the brain of patients with AD pathology [19].

Although main receptors and bile acid transporters (Table 1) have been found in the brain [6,27], little is known about the primary signaling pathways mediating their neuroprotective effects [28]. Bile acids could act directly in the brain through binding to the central FXR and TGR5, or indirectly by intermediate agents released after interaction of bile acids with receptors in the gut, such as fibroblast growth factor 19 and glucagon-like peptide 1, both capable of signaling to the central nervous system [6].

TABLE 2. CLINICAL STUDIES EVALUATING BILE ACIDS IN NEURODEGENERATIONS.

Biliary acid	Study design	Number of patients	Disease	Dose	Route	Main results
UDCA	Randomized, non-controlled	18	Amyotrophic lateral sclerosis	15, 30 or 50 mg/kg/day during 4 weeks	Orally	-Excellent safety and tolerability -Cerebrospinal fluid penetration in a dose-dependent manner
UDCA	Double-blind, placebo-controlled, randomized, crossover; single center, phase III trial	63 (16 analyzed)	Amyotrophic lateral sclerosis	3.5 g/140 ml/day for 3 months	Orally (solubilized)	The rate of progression (assessed by the Appel ALS rating scale) was significantly lower in patients treated with UDCA compared to placebo
TUDCA	Double-blind placebo-controlled, randomized, multi-center, phase II trial	34 (29 analyzed)	Amyotrophic lateral sclerosis	1 g day for 54 weeks	Orally	Deterioration of function (assessed by the ALS Functional Rating Scale Revised) was significantly slower in TUDCA group compared to placebo

ALS: Amyotrophic lateral sclerosis, UDCA: Ursodeoxycholic acid, TUDCA: Tauroursodeoxycholic acid

In the brain, it was shown that TUDCA binding to TGR5 microglia induced anti-inflammatory mediators by increasing intracellular cAMP levels [29]. Additionally, through MR binding in primary neurons, TUDCA counteracted amyloid beta-peptide-induced neuronal apoptosis [30]. Moreover, it has been reported that bile acids can modulate neurotransmitter activity [28]. For instance, UDCA was found to inhibit GABAergic currents and to serve as an antagonist for gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptors expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells [31].

Neuroprotective effects of UDCA and TUDCA in retinal disorders: UDCA and TUDCA have shown neuroprotective effects in several models of retinal disease: photoreceptor degeneration, retinal ganglion cell (RGC) degeneration, diabetic retinopathy, and laser-induced choroidal neovascularization, at variable doses and routes of administration (Table 3). The known mechanisms of action of biliary acids in retinal disease models at the level of the RPE, photoreceptors, RGCs, and the blood–retinal barrier (BRB) are summarized in Figure 2. Antiapoptotic effects of biliary acids in retinal disease models have been described by suppression of caspase-dependent and independent pathways (apoptosis-inducing factor (AIF) release) or reduction of ER stress. Anti-inflammatory and antioxidant effects have also been reported, as well as preservation of the BRB.

Photoreceptor degeneration—Photoreceptors are specialized neurons critical for vision. They are responsible for visual phototransduction, the first step in converting light energy into a neurosensory signal. Photoreceptor degeneration is present in several retinal diseases of different etiologies, including retinitis pigmentosa, Leber congenital amaurosis, and retinal detachment.

TUDCA suppressed caspase-dependent apoptosis mechanisms (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) and caspase 3 immunoreactivity; Figure 2) and preserved function and morphology of photoreceptors in several models of retinal degeneration in which apoptosis is the final common pathway of photoreceptor cell death [32-35], such as the light-induced retinal damage model [2,36], and three models of retinitis pigmentosa: the rd10 mouse [2,36-38], the P23H rat [39], and the Pde6b (rd1) mouse. When ER function is disrupted, unfolded proteins accumulate within the organelle, which is called ER stress. The unfolded protein response (UPR) may lead to apoptosis in the case of prolonged or severe ER stress [40]. In *Lrat*^{-/-}, a murine model of Leber congenital amaurosis, S-opsin aggregation induces ER stress and subsequent cone degeneration [40]. In this model, TUDCA reduced not only caspase 3-mediated apoptosis but also ER stress markers (decrease in

UPR CHOP and degradation of cone membrane associated proteins; Figure 2), thus preserving cone density [41,42]. In a mouse model of Bardet-Biedl syndrome type 1 (retinitis pigmentosa and obesity), TUDCA not only preserved retinal function and outer nuclear layer thickness but also prevented obesity [38].

In addition to apoptotic mechanisms, oxidative stress could play a role in photoreceptor cell death in various models of retinal degeneration, including light-induced retinal damage models and retinal detachment models [36,43]. TUDCA not only preserved photoreceptors from apoptosis but also reduced retinal oxidative stress markers, such as superoxide radical levels in a model of retinal light damage [36], and carbonyl-protein content in a rat model of retinal detachment [43] (Figure 2).

The beneficial effects of TUDCA also resulted from its anti-inflammatory activity as shown in P23H rats, in which the bile acid reduced the number and activation of microglia cells (Iba 1 and MHC-II, Figure 2) [44]. Interestingly, TUDCA enhanced phagocytosis of photoreceptors outer segments by RPE via the activation of Mer tyrosine kinase (MerTK) receptor activation (Figure 2), which has an important role in physiologic renewal of photoreceptor outer segments [45].

RGC degeneration—RGCs transmit visual information from the retina to the midbrain for processing and interpretation. Among diseases affecting RGCs, investigations have focused on glaucoma and Leber hereditary optic neuropathy.

Excessive stimulation of NMDA receptors could lead to RGC death by inducing a series of events, such as perturbation of Na⁺/K⁺ homeostasis, Ca²⁺ overload, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress [46]. In a model of RGC excitotoxicity induced by the intravitreal administration of N-methyl-D-aspartate (NMDA) in rats, the systemic administration of TUDCA increased RGC survival and function [47].

In a rat optic nerve crush model, RGC death occurs by caspase dependent-apoptosis [48], and topical administration of TUDCA increased the density of RGCs compared to PBS-treated animals [49]. In cat wholemount retinas, TUDCA restored partially the retinal neurocircuitry deterioration and subsequent abnormal visual response of RGCs [50]. Critically, a metabolomic study performed on fibroblasts collected from patients with Leber hereditary optic neuropathy (LHON) revealed that elevation of markers of LHON-associated ER stress was reversed with TUDCA treatment (Figure 2) [51].

Diabetic retinopathy—All retinal cell types are affected by diabetic retinopathy (DR): endothelial cells and pericytes of retinal vessels, RPE cells, glial cells, and retinal neurons,

TABLE 3. URSO- AND TAUROURSOEXOCHOLIC ACIDS IN DIFFERENT MODELS OF RETINAL DISEASE.

Biliary acid	Study design	Model (Disease)	Dose/ Concentration	Route	References
TUDCA	In vivo	rd10 mouse (PR) and LIRD mouse	500 mg/kg x2 or x4	Subcutaneous injection	[2]
TUDCA	In vivo	rd10 mouse	500 mg/kg every 3 days (x8)	Subcutaneous injection	[37]
TUDCA	In vivo	rd11 mouse	500 mg/kg every 3 days (x5)	Subcutaneous injection	[86]
UDCA	In vivo	CNV laser-treated rat	TUDCA 500 mg/kg/day. UDCA 100 mg/kg/day Before laser and for 14 days	Intraperitoneal injection	[60]
TUDCA	In vivo	P23H rat (PR)	500 mg/kg once a week (x14)	Intraperitoneal injection	[39]
TUDCA	In vivo	Retinal detachment induced Brown Norway rats	500 mg/kg daily X3 or X5	Intraperitoneal injection	[43]
TUDCA	In vivo	rd10 mouse and LIRD mouse	500 mg/kg x1 or every 3 day (x14)	Intraperitoneal injection	[36]
TUDCA	In vivo	Bbs/M390R/M390R mice rd10 mouse rd11 and rd16 mice	500 mg/kg twice a week, (x22) every 3 days (x11) daily (x24)	Subcutaneous injection	[38]
TUDCA	In vivo	Lrat-/- mouse (LCA)	500 mg/kg every 3 days (x6)	Subcutaneous injection	[41]
TUDCA	In vitro	Retinal cell exposed to high glucose	100 μM/day from D2-D7	-	[55]
TUDCA	In vitro	STZ-induced (diabetic) rat retinas	100 μM/day 7 days	-	[56]
TUDCA	In vivo	P23H rat	500 mg/kg weekly (x14)	Intraperitoneal injection	[44]
TUDCA	In vivo	Lrat-/- mouse (LCA)	500 mg/kg every 3 days (x8)	Subcutaneous injection	[42]
TUDCA	In vivo	NMDA-induced damage in rat	500 mg/kg/day (x 6)	Intraperitoneal injection	[47]
TUDCA	In vitro	Cat retinal ganglion cells	0.5 μM, 25 ml, 5 min	-	[50]
TUDCA	In vitro	SD rats retinal explants cultured in advanced glycation end-products	100 μM, 7 days	-	[87]
TUDCA	In vitro	ARPE-19, primary human RPE cells	30–300 μM 1 h	-	[45]
TUDCA	In vitro	High glucose-induced HRMECs	5.0 μM, 25.0 μM and 125.0 μM		[88]
TUDCA	In vivo	STZ-induced (diabetic) rat	250 mg/kg/d and 500 mg/kg/d		
TUDCA	In vitro	Leber hereditary optic neuropathy fibroblasts	100 μM, 24 h		[51]
TUDCA	In vivo	rd11 mouse	500 mg/kg every 3 days (x15)	Intraperitoneal injection	[89]
UDCA	In vivo	STZ-induced (diabetic) mice	100 mg/kg/d 6 weeks	Intraperitoneal injection	[57]
TUDCA	In vivo	P23H rat	5.05±0.11 μg/mg microspheres	Intravitreal injection	[90]
UDCA	In vivo	STZ-induced (diabetic) mice	15,30 mg/kg 1 months	Oral	[58]
TUDCA	In vivo	Optic nerve crush rat model	100 mM TUDCA 14 days	Topically, 1 drop every 12 h	[49]

TUDCA: Tauroursodeoxycholic acid, UDCA: ursodeoxycholic acid, LIRD: light-induced retinal degeneration; PR: Pigmentary Retinopathy, LCA: Leber congenital amaurosis

including photoreceptors and RGCs. The exact cause of DR is unknown, but postulated mechanisms are hyperglycemia, advanced glycation end products (AGE), activation of cytokines, inflammation, and oxidative stress [52,53] that lead to microangiopathy, BRB breakdown, and cell death [54].

TUDCA decreased cell death in rat retinal neural cells exposed to elevated glucose concentration [55]. This was accompanied by decreased annexin V and TUNEL labeling, mitonuclear translocation of AIF, as well as by decreased oxidative stress (protein carbonyl and reactive oxygen species production; Figure 2) [55]. Additionally, Oshitari et al. [56] showed that the numbers of p-c-Jun- and p-JNK-immunopositive RGCs were higher, and the numbers of regenerating neurites were lower, in diabetic rat retinas and in retinas exposed to high glucose, which was partially improved with TUDCA (Figure 2). ER stress and inflammation occurring in diabetic retinopathy could also be suppressed by UDCA, thus preventing pericyte loss [57]. UPR markers and inflammatory cytokines, such as MPC-1 and TNF- α , were attenuated following UDCA treatment in streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice, as well as in human retinal pericytes exposed

to AGE or modified low-density lipoprotein (mLDL; Figure 2) [57]. Additionally, UDCA attenuates BRB breakdown during DR by reversing the reduced expression of claudin-1 and claudin 19 in STZ-treated diabetic mice (Figure 2) [58]. UDCA decreased retinal inflammation by reducing the nuclear translocation of p65 subunit of NF- κ B in retinas from STZ-induced diabetic mice and the retinal expression of TNF- α , interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and vascular endothelial growth factor (VEGF) in STZ-induced diabetic mice (Figure 2) [58].

More recently, it has been shown that intermittent fasting prevented diabetic retinopathy in db/db mice by restructuring the microbiota toward species producing TUDCA [59]. It was concluded that this confers retinal protection by TGR5 activation and subsequent suppression of TNF- α expression (Figure 2) [59].

Laser-induced choroidal neovascularization—Choroidal neovascularization (CNV) is a complication that leads to visual loss in several retinal diseases, including age-related macular degeneration, inflammatory retinal diseases,

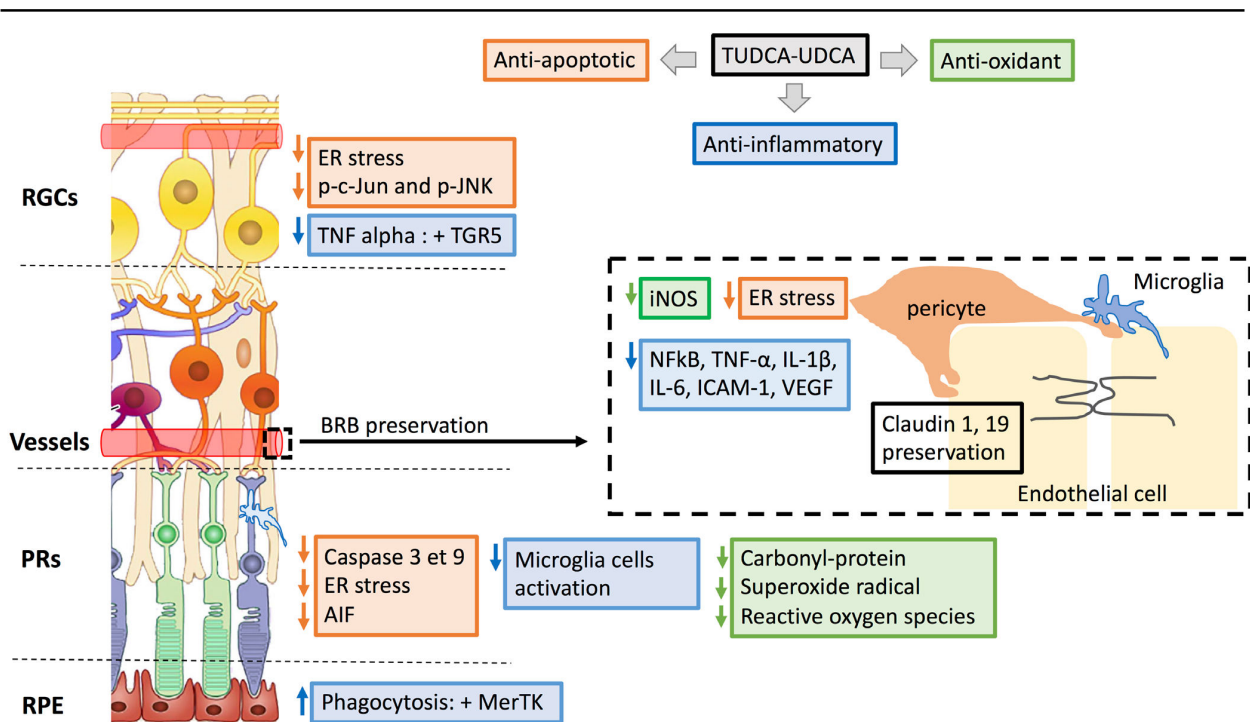


Figure 2. Mechanisms involved in urso- and tauroursodeoxycholic acid neuroprotective effects in retinal disease. Antiapoptotic (orange), anti-inflammatory (blue), and antioxidant effects of biliary acids described in retinal disease models, at the level of retinal ganglion cells (RGCs), photoreceptors (PRs), RPE, and the blood–retinal barrier (BRB; vascular endothelial cells, pericytes, and microglia). ER: endoplasmic reticulum; AIF: apoptosis-inducing factor; NF- κ B: nuclear factor-kappa B; TNF: tumor necrosis factor; IL: interleukin, ICAM: intercellular cell adhesion molecule; iNOS: inducible nitric oxide synthase; VEGF: vascular endothelial growth factor.

or myopia. Woo et al. [60] showed that TUDCA and UDCA, intraperitoneally administered, significantly suppressed laser-induced CNV formation in rats. This effect might be associated with anti-inflammatory action of the bile acids. However, the VEGF level in the retina was significantly lower only in the TUDCA-treated group compared to the control group, suggesting a different mechanism of action for UDCA.

UDCA and TUDCA signaling pathways in the retina—Receptors and transporters for bile acids have been identified in the retina (Table 1): TGR5 in primary retinal ganglion cells [59], S1PR2 in the inner nuclear layer of the rat retina, particularly in bipolar cells [61], and in mouse retinal endothelial cells [62], and $\alpha 5\beta 1$ integrin in the vessels of the adult retina [63] and in astrocytes [64]. VDR is also expressed in the retina [65,66], and PXR has been found in RPE cells [67]. GR and MR have been described in the cells of the inner nuclear layer of the retina, particularly in Müller glial cells, and in amacrine cells [68,69] and in the RPE [67].

Among known transporters of bile acids, organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporter has been described at the BRB [70,71], the neuroretina [72], and the RPE [73]. OATP1A2 is expressed in photoreceptor and amacrine cells, and OATP1B2 is found in the inner nuclear and plexiform layers [72]. Additionally, the multidrug resistance protein (MDR) 4 transporter has been detected in retinal vascular endothelial cells [74]. Conversely, other transporters of bile acid, such as ASBT, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP), and bile salt export pump (BSEP), have not been described in the retina. The first described bile acid receptor, the FXR, has also not been reported in the retina, although a proteomic analysis of subretinal fluid revealed overexpression of the FXR pathway [75] in central serous chorioretinopathy compared with retinal detachment.

Although the machinery of bile acids has been partially found in the retina, specific interaction of UDCA and TUDCA with these receptors or transporters has been rarely explored. A recent report by Beli et al. suggested TGR5 activation by TUDCA in retinal ganglion cells. In addition, it has been shown that TUDCA could activate the MerTK receptor in RPE cells [45], and could directly interact with rhodopsin [76]. Interestingly, taurine, the constitutive amino acid of TUDCA molecule, is the most abundant amino acid in the retina [77]. Photoreceptors are particularly rich in taurine, and all retinal cells take up taurine from the extracellular milieu. High- and low-affinity Na^+ - and Cl^- -dependent taurine transporters have been described in the retina. The principal transport protein is the high-affinity TauT transporter [78]. Additionally, it is known that treatment with taurine can

prevent retinal neurodegeneration [79]. A taurine-specific receptor has not been yet identified, but it has been suggested that taurine neuroprotection could be mediated by GABA receptor stimulation [79]. Whether taurine and TUDCA share mechanisms of action remains to be elucidated. Finally, no UDCA receptor interaction has been described. It is known that UDCA does not bind to the FXR [9,80], and because UDCA is a non-conjugated bile acid, a different molecular mechanism of action might be expected.

Clinical trials of bile acids for neurodegeneration

Although there is increasing evidence supporting a potential therapeutic role for bile acids in neurodegenerative disorders, their benefit in a clinical setting remains poorly explored. Only three clinical studies evaluating the safety and efficacy of oral bile acids have been reported, in patients with ALS [24-26] (Table 2). To date, there is no clinical study reporting the evaluation of bile acids in retinal disorders. Registered clinical trials of bile acids for neurodegeneration are summarized in Table 4, none of which has results available to date.

DISCUSSION

Consistent evidence has shown the protective role of TUDCA and UDCA in retinal disorders. Importantly, TUDCA treatment in photoreceptor and RGC degeneration models not only inhibited apoptosis but also promoted cell survival and function [37,47]. TUDCA was shown to protect from caspase-dependent [2,43] and independent (AIF) apoptosis [55] and from ER stress-mediated apoptosis [41,42]. Additionally, anti-inflammatory and antioxidant effects have been reported for TUDCA in photoreceptor degeneration models [36,43,55]. How bile acids interact with retinal cells remains imperfectly understood although a direct interaction of TUDCA with TRG5 has been described in RGCs [59].

The cytoprotective effect of UDCA has been less extensively explored, mostly in models of diabetic retinopathy, where UDCA preserved the BRB and exerted antiapoptotic (ER stress mediated), anti-inflammatory, and antioxidant mechanisms [57,58]. Comparative efficacy of TUDCA and UDCA has been explored only in a laser-induced CNV model, showing similar effects but probably by different mechanisms [60].

Although UDCA and TUDCA have been found in cerebrospinal fluid after oral administration [24], no clinical studies have evaluated the ocular biodistribution of bile acids. Moreover, little is known about the role of endogenous circulating bile acids in the retina. Secondary bile acids are present in the systemic circulation after being absorbed by the intestine and released in the portal vein [5]. The mechanisms that regulate bile acids levels in the systemic circulation have

TABLE 4. REGISTERED TRIALS OF THE BILE ACIDS FOR NEURODEGENERATIONS

Status	Study title	ClinicalTrials.gov Identifier	Condition	Study design	Intervention
Completed	Ursodeoxycholic Acid for Rhegmatogenous Retinal Detachment	NCT02841306	Rhegmatogenous Retinal Detachment	Phase 1 clinical trial Non-randomized Parallel Assignment Open labeled	UDCA 26 participants
Recruiting	Trial of Ursodeoxycholic Acid (UDCA) for Parkinson Disease: The "UP" Study	NCT03840005	Parkinson Disease	Phase 2 clinical trial Placebo Controlled, Randomized Double Blind	UDCA 30 participants
Not yet recruiting	Brain Bioenergetics in Parkinson Disease and Response to Repeated Oral UDCA Treatment	NCT02967250	Parkinson Disease	Phase 1 clinical trial Non-randomized Open labeled Single Group Assignment	UDCA 20 participants
Unknown status	Ursodiol in Huntington's Disease	NCT00514774	Huntington Disease	Phase 1 clinical trial Randomized Parallel Assignment Double Blind	UDCA 21 participants
Recruiting	Safety and Efficacy of TUDCA as add-on Treatment in Patients Affected by Amyotrophic Lateral Sclerosis	NCT03800524	Amyotrophic Lateral Sclerosis	Phase 3 clinical trial Placebo Controlled, Randomized Double Blind	TUDCA 440 participants
Recruiting	A Trial of Bile Acid Supplementation in Patients With Multiple Sclerosis	NCT03423121	Progressive Multiple Sclerosis	Phase 1–2 clinical trial Placebo Controlled, Randomized Double Blind	TUDCA 60 participants
Recruiting	Study to Assess the Safety and Biologic Activity of AMX0035 for the Treatment of Alzheimer Disease	NCT03533257	Alzheimer Disease	Phase 2 clinical trial Placebo Controlled, Randomized Double Blind	AMX0035 (TUDCA and Phenylbutyrate) 100 participants
Active, non-recruiting	AMX0035 in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis	NCT03127514	Amyotrophic Lateral Sclerosis	Phase 2 clinical trial Placebo Controlled, Randomized Double Blind	AMX0035 (TUDCA and Phenylbutyrate) 132 participants
Enrolling by invitation	Open Label Extension Study of AMX0035 in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis	NCT03488524	Amyotrophic Lateral Sclerosis	Phase 2 clinical trial Single Group Assignment Non-randomized Open label	AMX0035 (TUDCA and Phenylbutyrate) 132 participants

not been fully explored, and the role of the microbiota seems central, as it is responsible for the transformation of primary bile acids to secondary neuroprotectant ones [5]. The levels of circulating secondary bile acids could result from increased production by the microbiota or from and increased intestine permeability, known to be also influenced by the microbiota [81]. In the cerebrospinal fluid, the levels of TUDCA are proportional to the circulating levels [6], but in the retina and the ocular media, the levels of bile acids have not been evaluated.

As studies increasingly link neurodegenerative disease to the state of the microbiota [82-85], we hypothesize that the effects of alterations to the microbiome on circulating bile acids may induce or exacerbate neurodegenerative processes, and specifically, retinal degeneration. Thus, therapeutic use of bile acids in retinal disease should be further investigated.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors acknowledge support from the Abraham J and Phyllis Katz Foundation, USA; Fondation de l'avenir, France; Association Française des Amblyopes Unilatéraux, France; NIH R01EY028859 and VA I01RX002806, USA. Authors have no commercial interests in the subject of the manuscript or in entities discussed in the manuscript.

REFERENCES

- Monte MJ, Marin JGG, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol* 2009; 15:804-16. [PMID: 19230041].
- Boatright JH, Moring AG, McElroy C, Phillips MJ, Do VT, Chang B, Hawes NL, Boyd AP, Sidney SS, Stewart RE, Minear SC, Chaudhury R, Ciavatta VT, Rodrigues CMP, Steer CJ, Nickerson JM, Pardue MT. Tool from ancient pharmacopoeia prevents vision loss. *Mol Vis* 2006; 12:1706-14. [PMID: 17213800].
- Vang S, Longley K, Steer CJ, Low WC. The Unexpected Uses of Urso- and Tauroursodeoxycholic Acid in the Treatment of Non-liver Diseases. *Glob Adv Health Med* 2014; 3:58-69. [PMID: 24891994].
- Tonin F, Arends IWCE. Latest development in the synthesis of ursodeoxycholic acid (UDCA): a critical review. *Beilstein J Org Chem* 2018; 14:470-83. [PMID: 29520309].
- Alrefai WA, Gill RK. Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res* 2007; 24:1803-23. [PMID: 17404808].
- Mertens KL, Kalsbeek A, Soeters MR, Eggink HM. Bile Acid Signaling Pathways from the Enterohepatic Circulation to the Central Nervous System. *Front Neurosci* 2017; 11:617- [PMID: 29163019].
- Reinicke M, Schröter J, Müller-Klieser D, Helmschrodt C, Ceglarek U. Free oxysterols and bile acids including conjugates - Simultaneous quantification in human plasma and cerebrospinal fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2018; 1037:245-55. [PMID: 30292299].
- Copple BL, Li T. Pharmacology of bile acid receptors: Evolution of bile acids from simple detergents to complex signaling molecules. *Pharmacol Res* 2016; 104:9-21. [PMID: 26706784].
- Amaral JD, Viana RJS, Ramalho RM, Steer CJ, Rodrigues CMP. Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *J Lipid Res* 2009; 50:1721-34. [PMID: 19417220].
- Staels B, Fonseca VA. Bile acids and metabolic regulation: mechanisms and clinical responses to bile acid sequestration. *Diabetes Care* 2009; 32:Suppl 2S237-45. [PMID: 19875558].
- Gohlke H, Schmitz B, Sommerfeld A, Reinehr R, Häussinger D. $\alpha 5 \beta 1$ -integrins are sensors for tauroursodeoxycholic acid in hepatocytes. *Hepatology* 2013; 57:1117-29. [PMID: 22865233].
- European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol* 2009; 51:237-67. [PMID: 19501929].
- Solá S, Amaral JD, Castro RE, Ramalho RM, Borralho PM, Kren BT, Tanaka H, Steer CJ, Rodrigues CMP. Nuclear translocation of UDCA by the glucocorticoid receptor is required to reduce TGF-beta1-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 2005; 42:925-34. [PMID: 16175607].
- Solá S, Castro RE, Kren BT, Steer CJ, Rodrigues CMP. Modulation of nuclear steroid receptors by ursodeoxycholic acid inhibits TGF-beta1-induced E2F-1/p53-mediated apoptosis of rat hepatocytes. *Biochemistry* 2004; 43:8429-38. [PMID: 15222754].
- Dionísio PA, Amaral JD, Ribeiro MF, Lo AC, D'Hooge R, Rodrigues CMP. Amyloid- β pathology is attenuated by tauroursodeoxycholic acid treatment in APP/PS1 mice after disease onset. *Neurobiol Aging* 2015; 36:228-40. [PMID: 25443293].
- Lo AC, Callaerts-Vegh Z, Nunes AF, Rodrigues CMP, D'Hooge R. Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) supplementation prevents cognitive impairment and amyloid deposition in APP/PS1 mice. *Neurobiol Dis* 2013; 50:21-9. [PMID: 22974733].
- Ramalho RM, Nunes AF, Dias RB, Amaral JD, Lo AC, D'Hooge R, Sebastião AM, Rodrigues CMP. Tauroursodeoxycholic acid suppresses amyloid β -induced synaptic toxicity in vitro and in APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging* 2013; 34:551-61. [PMID: 22621777].
- Nunes AF, Amaral JD, Lo AC, Fonseca MB, Viana RJS, Callaerts-Vegh Z, D'Hooge R, Rodrigues CMP. TUDCA, a bile acid, attenuates amyloid precursor protein processing and amyloid- β deposition in APP/PS1 mice. *Mol Neurobiol* 2012; 45:440-54. [PMID: 22438081].

19. Pan X, Elliott CT, McGuinness B, Passmore P, Kehoe PG, Hölscher C, McClean PL, Graham SF, Green BD. Metabolomic Profiling of Bile Acids in Clinical and Experimental Samples of Alzheimer's Disease. *Metabolites* 2017; 7:28-[\[PMID: 28629125\]](#).
20. Abdelkader NF, Safar MM, Salem HA. Ursodeoxycholic Acid Ameliorates Apoptotic Cascade in the Rotenone Model of Parkinson's Disease: Modulation of Mitochondrial Perturbations. *Mol Neurobiol* 2016; 53:810-7. [\[PMID: 25502462\]](#).
21. Castro-Caldas M, Carvalho AN, Rodrigues E, Henderson CJ, Wolf CR, Rodrigues CMP, Gama MJ. Tauroursodeoxycholic acid prevents MPTP-induced dopaminergic cell death in a mouse model of Parkinson's disease. *Mol Neurobiol* 2012; 46:475-86. [\[PMID: 22773138\]](#).
22. Rosa AI, Fonseca I, Nunes MJ, Moreira S, Rodrigues E, Carvalho AN, Rodrigues CMP, Gama MJ, Castro-Caldas M. Novel insights into the antioxidant role of tauroursodeoxycholic acid in experimental models of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017; 1863:2171-81. [\[PMID: 28583715\]](#).
23. Keene CD, Rodrigues CMP, Eich T, Chhabra MS, Steer CJ, Low WC. Tauroursodeoxycholic acid, a bile acid, is neuroprotective in a transgenic animal model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:10671-6. [\[PMID: 12149470\]](#).
24. Parry GJ, Rodrigues CMP, Aranha MM, Hilbert SJ, Davey C, Kelkar P, Low WC, Steer CJ. Safety, tolerability, and cerebrospinal fluid penetration of ursodeoxycholic Acid in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neuropharmacol* 2010; 33:17-21. [\[PMID: 19935406\]](#).
25. Min J-H, Hong Y-H, Sung J-J, Kim S-M, Lee JB, Lee K-W. Oral solubilized ursodeoxycholic acid therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a randomized cross-over trial. *J Korean Med Sci* 2012; 27:200-6. [\[PMID: 22323869\]](#).
26. Elia AE, Lalli S, Monsurrò MR, Sagnelli A, Taiello AC, Reggiori B, La Bella V, Tedeschi G, Albanese A. Tauroursodeoxycholic acid in the treatment of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol* 2016; 23:45-52. [\[PMID: 25664595\]](#).
27. McMillin M, DeMorrow S. Effects of bile acids on neurological function and disease. *FASEB J* 2016; 30:3658-68. [\[PMID: 27468758\]](#).
28. Ackerman HD, Gerhard GS. Bile Acids in Neurodegenerative Disorders. *Front Aging Neurosci* 2016; 8:263-[\[PMID: 27920719\]](#).
29. Yanguas-Casás N, Barreda-Manso MA, Nieto-Sampedro M, Romero-Ramírez L. TUDCA: An Agonist of the Bile Acid Receptor GPCBAR1/TGR5 With Anti-Inflammatory Effects in Microglial Cells. *J Cell Physiol* 2017; 232:2231-45. [\[PMID: 27987324\]](#).
30. Solá S, Amaral JD, Borralho PM, Ramalho RM, Castro RE, Aranha MM, Steer CJ, Rodrigues CMP. Functional modulation of nuclear steroid receptors by tauroursodeoxycholic acid reduces amyloid beta-peptide-induced apoptosis. *Mol Endocrinol* 2006; 20:2292-303. [\[PMID: 16728529\]](#).
31. Yanovsky Y, Schubring SR, Yao Q, Zhao Y, Li S, May A, Haas HL, Lin J-S, Sergeeva OA. Waking action of ursodeoxycholic acid (UDCA) involves histamine and GABAA receptor block. *PLoS One* 2012; 7:e42512-[\[PMID: 22880010\]](#).
32. Chang CJ, Lai WW, Edward DP, Tso MO. Apoptotic photoreceptor cell death after traumatic retinal detachment in humans. *Arch Ophthalmol Chic Ill* 1960; 1995:880-6. [\[PMID: 7605279\]](#).
33. Viringipurampeer IA, Gregory-Evans CY, Metcalfe AL, Bashar E, Moritz OL, Gregory-Evans K. Cell Death Pathways in Mutant Rhodopsin Rat Models Identifies Genotype-Specific Targets Controlling Retinal Degeneration. *Mol Neurobiol* 2019; 56:1637-52. [\[PMID: 29911255\]](#).
34. Sizova OS, Shinde VM, Lenox AR, Gorbatyuk MS. Modulation of cellular signaling pathways in P23H rhodopsin photoreceptors. *Cell Signal* 2014; 26:665-72. [Internet\[PMID: 24378535\]](#).
35. Wenzel A, Grimm C, Samardzija M, Remé CE. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2005; 24:275-306. [\[PMID: 15610977\]](#).
36. Oveson BC, Iwase T, Hackett SF, Lee SY, Usui S, Sedlak TW, Snyder SH, Campochiaro PA, Sung JU. Constituents of bile, bilirubin and TUDCA, protect against oxidative stress-induced retinal degeneration. *J Neurochem* 2011; 116:144-53. [\[PMID: 21054389\]](#).
37. Phillips MJ, Walker TA, Choi H-Y, Faulkner AE, Kim MK, Sidney SS, Boyd AP, Nickerson JM, Boatright JH, Pardue MT. Tauroursodeoxycholic acid preservation of photoreceptor structure and function in the rd10 mouse through postnatal day 30. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49:2148-55. [\[PMID: 18436848\]](#).
38. Drack AV, Dumitrescu AV, Bhattarai S, Gratie D, Stone EM, Mullins R, Sheffield VC. TUDCA slows retinal degeneration in two different mouse models of retinitis pigmentosa and prevents obesity in Bardet-Biedl syndrome type 1 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53:100-6. [\[PMID: 22110077\]](#).
39. Fernández-Sánchez L, Lax P, Pinilla I, Martín-Nieto J, Cuenca N. Tauroursodeoxycholic acid prevents retinal degeneration in transgenic P23H rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52:4998-5008. [\[PMID: 21508111\]](#).
40. Zhang SX, Sanders E, Fliesler SJ, Wang JJ. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein responses in retinal degeneration. *Exp Eye Res* 2014; 125:30-40. [\[PMID: 24792589\]](#).
41. Zhang T, Baehr W, Fu Y. Chemical Chaperone TUDCA Preserves Cone Photoreceptors in a Mouse Model of Leber Congenital Amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53:3349-56. [Internet\[PMID: 22531707\]](#).
42. Fu Y, Zhang T. Pathophysiological mechanism and treatment strategies for Leber congenital amaurosis. *Adv Exp Med Biol* 2014; 801:791-6. [\[PMID: 24664772\]](#).

43. Mantopoulos D, Murakami Y, Comander J, Thanos A, Roh M, Miller JW, Vavvas DG. Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) protects photoreceptors from cell death after experimental retinal detachment. *PLoS One* 2011; 6:e24245- [PMID: 21961034].
44. Noailles A, Fernández-Sánchez L, Lax P, Cuenca N. Microglia activation in a model of retinal degeneration and TUDCA neuroprotective effects. *J Neuroinflammation* 2014; 11:186- [PMID: 25359524].
45. Murase H, Tsuruma K, Shimazawa M, Hara H. TUDCA Promotes Phagocytosis by Retinal Pigment Epithelium via MerTK Activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56:2511-8. [PMID: 25804419].
46. Sucher NJ, Lipton SA, Dreyer EB. Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Res* 1997; 37:3483-93. [PMID: 9425525].
47. Gómez-Vicente V, Lax P, Fernández-Sánchez L, Rondón N, Esquivá G, Germain F, de la Villa P, Cuenca N. Neuroprotective Effect of Tauroursodeoxycholic Acid on N-Methyl-D-Aspartate-Induced Retinal Ganglion Cell Degeneration. *PLoS One* 2015; 10:e0137826- [PMID: 26379056].
48. Thomas CN, Berry M, Logan A, Blanch RJ, Ahmed Z. Caspases in retinal ganglion cell death and axon regeneration. *Cell Death Dis* 2017; 3:17032- [PMID: 29675270].
49. Kitamura Y, Bikbova G, Baba T, Yamamoto S, Oshitari T. In vivo effects of single or combined topical neuroprotective and regenerative agents on degeneration of retinal ganglion cells in rat optic nerve crush model. *Sci Rep* 2019; 9:101- [PMID: 30643179].
50. Xia H, Nan Y, Huang X, Gao J, Pu M. Effects of Tauroursodeoxycholic Acid and Alpha-Lipoic-Acid on the Visual Response Properties of Cat Retinal Ganglion Cells: An In Vitro Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56:6638-45. [PMID: 26469749].
51. Chao de la Barca JM, Simard G, Amati-Bonneau P, Safiedeen Z, Prunier-Mirebeau D, Chupin S, Gadrás C, Tessier L, Gueguen N, Chevrollier A, Desquirit-Dumas V, Ferré M, Bris C, Kouassi Nzoughet J, Bocca C, Leruez S, Verny C, Miléa D, Bonneau D, Lenaers G, Martínez MC, Procaccio V, Reynier P. The metabolomic signature of Leber's hereditary optic neuropathy reveals endoplasmic reticulum stress. *Brain* 2016; 139:2864-76. [PMID: 27633772].
52. Pardue MT, Allen RS. Neuroprotective strategies for retinal disease. *Prog Retin Eye Res* 2018; 65:50-76. [PMID: 29481975].
53. Wan T-T, Li X-F, Sun Y-M, Li Y-B, Su Y. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic retinopathy. *Biomed Pharmacother* 2015; 74:145-7. [PMID: 26349976].
54. Daruich A, Matet A, Moulin A, Kowalczyk L, Nicolas M, Sellam A, Rothschild P-R, Omri S, Gélizé E, Jonet L, Delaunay K, De Kozak Y, Berdugo M, Zhao M, Crisanti P, Behar-Cohen F. Mechanisms of macular edema: Beyond the surface. *Prog Retin Eye Res* 2018; 63:20-68. [PMID: 29126927].
55. Gaspar JM, Martins A, Cruz R, Rodrigues CMP, Ambrósio AF, Santiago AR. Tauroursodeoxycholic acid protects retinal neural cells from cell death induced by prolonged exposure to elevated glucose. *Neuroscience* 2013; 253:380-8. [PMID: 24012838].
56. Oshitari T, Bikbova G, Yamamoto S. Increased expression of phosphorylated c-Jun and phosphorylated c-Jun N-terminal kinase associated with neuronal cell death in diabetic and high glucose exposed rat retinas. *Brain Res Bull* 2014; 101:18-25. [PMID: 24333191].
57. Chung Y-R, Choi JA, Koh J-Y, Yoon YH. Ursodeoxycholic Acid Attenuates Endoplasmic Reticulum Stress-Related Retinal Pericyte Loss in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *J Diabetes Res* 2017; 2017:1763292- [PMID: 28127564].
58. Ouyang H, Mei X, Zhang T, Lu B, Ji L. Ursodeoxycholic acid ameliorates diabetic retinopathy via reducing retinal inflammation and reversing the breakdown of blood-retinal barrier. *Eur J Pharmacol* 2018; 840:20-7. [PMID: 30268667].
59. Beli E, Yan Y, Moldovan L, Vieira CP, Gao R, Duan Y, Prasad R, Bhatwadekar A, White FA, Townsend SD, Chan L, Ryan CN, Morton D, Moldovan EG, Chu F-I, Oudit GY, Derendorf H, Adorini L, Wang XX, Evans-Molina C, Mirmira RG, Boulton ME, Yoder MC, Li Q, Levi M, Busik JV, Grant MB. Restructuring of the Gut Microbiome by Intermittent Fasting Prevents Retinopathy and Prolongs Survival in db/db Mice. *Diabetes* 2018; 67:1867-79. [PMID: 29712667].
60. Woo SJ, Kim JH, Yu HG. Ursodeoxycholic acid and tauroursodeoxycholic acid suppress choroidal neovascularization in a laser-treated rat model. *J Ocul Pharmacol Ther* 2010; 26:223-9. [PMID: 20565307].
61. Porter H, Qi H, Prabhu N, Gramberg R, McRae J, Hopia-vuori B, Mandal N. Characterizing Sphingosine Kinases and Sphingosine 1-Phosphate Receptors in the Mammalian Eye and Retina. *Int J Mol Sci* 2018; 19:3885- [PMID: 30563056].
62. Skoura A, Sanchez T, Claffey K, Mandala SM, Proia RL, Hla T. Essential role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in pathological angiogenesis of the mouse retina. *J Clin Invest* 2007; 117:2506-16. [PMID: 17710232].
63. Brem RB, Robbins SG, Wilson DJ, O'Rourke LM, Mixon RN, Robertson JE, Planck SR, Rosenbaum JT. Immunolocalization of integrins in the human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:3466-74. [PMID: 8056522].
64. Neumann C, Garreis F, Paulsen F, Hammer CM, Birke MT, Scholz M. Osteopontin is induced by TGF- β 2 and regulates metabolic cell activity in cultured human optic nerve head astrocytes. *PLoS One* 2014; 9:e92762- [PMID: 24718314].
65. Craig TA, Sommer S, Sussman CR, Grande JP, Kumar R. Expression and regulation of the vitamin D receptor in the zebrafish, *Danio rerio*. *J Bone Miner Res* 2008; 23:1486-96. [PMID: 18410235].
66. Taverna MJ, Selam J-L, Slama G. Association between a protein polymorphism in the start codon of the vitamin D receptor gene and severe diabetic retinopathy in C-peptide-negative type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:4803-8. [PMID: 15899948].

67. Zhang Y, Lu M, Sun X, Li C, Kuang X, Ruan X. Expression and activity of p-glycoprotein elevated by dexamethasone in cultured retinal pigment epithelium involve glucocorticoid receptor and pregnane X receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53:3508-15. [PMID: 22570346].
68. Gallina D, Zelinka C, Fischer AJ. Glucocorticoid receptors in the retina, Müller glia and the formation of Müller glia-derived progenitors. *Development* 2014; 141:3340-51. [PMID: 25085975].
69. Zhao M, Célérier I, Bousquet E, Jeanny J-C, Jonet L, Savoldelli M, Offret O, Curan A, Farman N, Jaisser F, Behar-Cohen F. Mineralocorticoid receptor is involved in rat and human ocular chorioretinopathy. *J Clin Invest* 2012; 122:2672-9. [PMID: 22684104].
70. Kubo Y, Akanuma S-I, Hosoya K-I. Recent advances in drug and nutrient transport across the blood-retinal barrier. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2018; 14:513-31. [PMID: 29719158].
71. Akanuma S, Hirose S, Tachikawa M, Hosoya K-I. Localization of organic anion transporting polypeptide (Oatp) 1a4 and Oatplc1 at the rat blood-retinal barrier. *Fluids Barriers CNS* 2013; 10:29-[PMID: 24083450].
72. Gao B, Vavricka SR, Meier PJ, Stieger B. Differential cellular expression of organic anion transporting peptides OATP1A2 and OATP2B1 in the human retina and brain: implications for carrier-mediated transport of neuropeptides and neurosteroids in the CNS. *Pflugers Arch* 2015; 467:1481-93. [PMID: 25132355].
73. Chan T, Zhu L, Madigan MC, Wang K, Shen W, Gillies MC, Zhou F. Human organic anion transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) mediates cellular uptake of all-trans-retinol in human retinal pigmented epithelial cells. *Br J Pharmacol* 2015; 172:2343-53. [PMID: 25560245].
74. Tagami M, Kusuhara S, Imai H, Uemura A, Honda S, Tsukahara Y, Negi A. MRP4 knockdown enhances migration, suppresses apoptosis, and produces aggregated morphology in human retinal vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 400:593-8. [PMID: 20804728].
75. Kowalczyk L, Matet A, Dor M, Bararpour N, Daruich A, Dirani A, Behar-Cohen F, Thomas A, Turck N. Proteome and Metabolome of Subretinal Fluid in Central Serous Chorioretinopathy and Rhegmatogenous Retinal Detachment: A Pilot Case Study. *Transl Vis Sci Technol* 2018; 7:3-[PMID: 29359109].
76. Lobysheva E, Taylor CM, Marshall GR, Kisselev OG. Tauroursodeoxycholic acid binds to the G-protein site on light activated rhodopsin. *Exp Eye Res* 2018; 170:51-7. [PMID: 29454859].
77. Ripps H, Shen W. Review: taurine: a “very essential” amino acid. *Mol Vis* 2012; 18:2673-86. [PMID: 23170060].
78. Sivakami S, Ganapathy V, Leibach FH, Miyamoto Y. The gamma-aminobutyric acid transporter and its interaction with taurine in the apical membrane of the bovine retinal pigment epithelium. *Biochem J* 1992; 283:391-7. [PMID: 1575683].
79. Hadj-Saïd W, Fradot V, Ivkovic I, Sahel J-A, Picaud S, Froger N. Taurine Promotes Retinal Ganglion Cell Survival Through GABAB Receptor Activation. *Adv Exp Med Biol* 2017; 975:687-701. [PMID: 28849492].
80. Howard WR, Pospisil JA, Njolito E, Noonan DJ. Catabolites of cholesterol synthesis pathways and forskolin as activators of the farnesoid X-activated nuclear receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 163:195-202. [PMID: 10698678].
81. Jena PK, Sheng L, Di Lucente J, Jin L-W, Maezawa I, Wan Y-JY. Dysregulated bile acid synthesis and dysbiosis are implicated in Western diet-induced systemic inflammation, microglial activation, and reduced neuroplasticity. *FASEB J* 2018; 32:2866-77. [PMID: 29401580].
82. McCombe PA, Henderson RD, Lee A, Lee JD, Woodruff TM, Restuadi R, McRae A, Wray NR, Ngo S, Steyn FJ. Gut microbiota in ALS: possible role in pathogenesis? *Expert Rev Neurother* 2019; •••:1-21. [PMID: 31122082].
83. Sasmita AO. Modification of the gut microbiome to combat neurodegeneration. *Rev Neurosci* 2019; In press [PMID: 31095511].
84. Miraglia F, Colla E. Microbiome, Parkinson’s Disease and Molecular Mimicry. *Cells* 2019; 8:222-[PMID: 30866550].
85. Kowalski K, Mulak A. Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer’s Disease. *J Neurogastroenterol Motil* 2019; 25:48-60. [PMID: 30646475].
86. Boatright JH, Nickerson JM, Moring AG, Pardue MT. Bile acids in treatment of ocular disease. *J Ocul Biol Dis Infor* 2009; 2:149-59. [PMID: 20046852].
87. Bikbova G, Oshitari T, Baba T, Yamamoto S. Altered Expression of NF- κ B and SP1 after Exposure to Advanced Glycation End-Products and Effects of Neurotrophic Factors in AGEs Exposed Rat Retinas. *J Diabetes Res* 2015; 2015:543818-[PMID: 26078979].
88. Wang C-F, Yuan J-R, Qin D, Gu J-F, Zhao B-J, Zhang L, Zhao D, Chen J, Hou X-F, Yang N, Bu W-Q, Wang J, Li C, Tian G, Dong Z-B, Feng L, Jia X-B. Protection of tauroursodeoxycholic acid on high glucose-induced human retinal microvascular endothelial cells dysfunction and streptozotocin-induced diabetic retinopathy rats. *J Ethnopharmacol* 2016; 185:162-70. [PMID: 26988565].
89. Lawson EC, Bhatia SK, Han MK, Aung MH, Ciavatta V, Boatright JH, Pardue MT. Tauroursodeoxycholic Acid Protects Retinal Function and Structure in rd1 Mice. *Adv Exp Med Biol* 2016; 854:431-6. [PMID: 26427442].
90. Fernández-Sánchez L, Bravo-Osuna I, Lax P, Arranz-Romera A, Maneu V, Esteban-Pérez S, Pinilla I, Puebla-González MDM, Herrero-Vanrell R, Cuenca N. Controlled delivery of tauroursodeoxycholic acid from biodegradable microspheres slows retinal degeneration and vision loss in P23H rats. *PLoS One* 2017; 12:e0177998-[PMID: 28542454].

Articles are provided courtesy of Emory University and the Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, P.R. China. The print version of this article was created on 14 October 2019. This reflects all typographical corrections and errata to the article through that date. Details of any changes may be found in the online version of the article.

1.4 La recherche translationnelle : définitions

La recherche peut être classifiée en :

- Recherche fondamentale
- Recherche clinique
- Recherche translationnelle

L'objectif principal de la recherche fondamentale est l'acquisition de connaissances sans obligation de les appliquer à des fins pratiques.¹⁵⁸ Il en résulte une connaissance générale et une compréhension de la nature et de ses lois. Cette connaissance générale permet de répondre à un grand nombre de problèmes pratiques importants, même si elle ne donne pas nécessairement une réponse spécifique à l'un d'entre eux.

La définition de la recherche clinique recouvre trois entités distinctes:¹⁵⁸

1. Une recherche axée sur le patient. Une recherche menée sur des humains (ou sur du matériel d'origine humaine tel que des tissus, des spécimens et des phénomènes cognitifs) pour laquelle un investigateur interagit directement avec des humains. Sont exclues de cette définition les études *in vitro* utilisant des tissus humains qui ne peuvent pas être liés à un individu vivant. La recherche axée sur le patient comprend: les mécanismes de la maladie humaine, les interventions thérapeutiques, les essais cliniques ou le développement de nouvelles technologies.
2. Des études épidémiologiques et comportementales.
3. La recherche sur les services de santé.

Finalement, la recherche translationnelle intègre des aspects de la recherche fondamentale et de la recherche clinique, nécessitant des compétences et des ressources des deux. La recherche translationnelle est définie comme un continuum dans lequel les résultats de la recherche sont

transférés de la paillasse des chercheurs au chevet du patient et à la communauté. Dans ce continuum, la première étape de la recherche translationnelle (T1) transfère les connaissances de la recherche fondamentale à la recherche clinique, tandis que la deuxième étape (T2) transfère les résultats d'études cliniques aux pratiques quotidiennes et aux communautés. La recherche translationnelle est spécialement conçue pour améliorer l'adoption des nouvelles pratiques et optimiser les résultats pour les patients.¹⁵⁸ Finalement, la recherche translationnelle inverse vise à utiliser des données ou des ressources cliniques pour permettre le développement ou la validation d'un concept de recherche fondamentale, lequel pourra servir à une application translationnelle directe.

Les modèles animaux de maladie rétinienne ne permettant pas de récapituler tous les aspects de la pathologie humaine car la vision des animaux de laboratoire diffère de celle des humains qui ont une vision diurne et une macula, il est crucial de réaliser des recherches translationnelles qui permettent de valider les concepts expérimentaux sur des échantillons ou prélèvements humains et même de partir de données cliniques et humaines.

Plus spécifiquement, dans les modèles de DR expérimentaux, la nature et la composition du LSR ne sont pas pris en compte puisque la rétine est décollée de façon mécanique par des substances qui évitent son ré attachement spontané, ce qui ne survient pas chez l'homme.

L'étude du LSR et ses effets sur des modèles ex vivo est une étape importante pour d'une part mieux comprendre les mécanismes de mort cellulaire dans la rétine chez l'homme et pour d'autre part se rapprocher de la réalité clinique.

2 Objectif du travail

Les données de la littérature mettent en évidence le nombre important de molécules qui ont été bénéfiques dans des modèles de DR contrastant avec l'absence de thérapies neuroprotectrices disponibles en clinique. Deux principaux obstacles s'opposent à la translation des données expérimentales à la clinique :

- la preuve que les résultats sont transposables chez l'homme
- la disponibilité d'une forme galénique utilisable et qui permet d'atteindre la rétine à des concentrations efficaces.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse était de développer deux approches complémentaires, neuroprotectrices adjuvantes à la chirurgie du décollement de la rétine, en utilisant une stratégie de recherche translationnelle permettant de valider des hypothèses expérimentales sur des données cliniques et des échantillons biologiques oculaires humains.

Le DR a été choisi comme maladie modèle car :

- Il s'agit d'un modèle rapide de mort des photorécepteurs, au niveau expérimental et clinique, favorisant ainsi l'évaluation de molécules neuroprotectrices dans un délai raisonnable.
- Plusieurs voies de mort cellulaire ont été impliqués dans le DR expérimental, facilitant ainsi l'étude des mécanismes d'action des molécules neuroprotectrices candidates.
- Il s'agit d'une maladie dont le traitement est chirurgical, favorisant l'accès aux prélèvements de liquides oculaires provenant de patients

Parmi les molécules neuroprotectrices à évaluer, la transferrine a été choisie car :

- Le rôle délétère du fer sur les photorécepteurs a été démontré dans d'autres maladies dégénératives de la rétine.
- Bien que l'effet neuroprotecteur de la transferrine ait été démontré dans d'autres maladies dégénératives de la rétine, son mécanisme d'action, au-delà de ses propriétés comme chélateur du fer, n'a pas été exploré en profondeur
- La transferrine est une molécule endogène naturelle qui peut être produite dans l'œil par une méthode de thérapie génique non virale issue du laboratoire (Eyevensys)

Dans un premier temps, nous avons donc exploré le profil du fer et de ses protéines régulatrices dans les liquides oculaires de patients atteints de DR, avant d'effectuer les expériences d'efficacité et l'exploration des mécanismes d'action en jeu, sur des modèles animaux.

L'UDCA a également été choisi comme molécule neuroprotectrice candidate dans le DR car :

- Le TUDCA, conjugué taurinique d'UDCA, a précédemment montré des effets neuroprotecteurs dans un modèle de DR *in vivo*.
- Bien que l'UDCA n'ait jamais été exploré dans des modèles de dégénérescence de photorécepteurs, à la différence de TUDCA, il est commercialisé sous forme galénique pour le traitement des cholestases hépatiques, facilitant ainsi son évaluation et son transfert clinique.

Nous avons donc évalué la biodisponibilité oculaire et la tolérance d'UDCA administré par voie orale, chez des patients présentant un DR, pour ensuite effectuer les études expérimentales d'efficacité et l'exploration des mécanismes d'action dans des modèles animaux.

3 Résultats

3.1 **Article 2: *Iron is neurotoxic in retinal detachment and transferrine confers neuroprotection***

(*Science Advances*, 2019)

Dans cette étude nous avons évalué, dans un premier temps, les concentrations de fer et le pourcentage de saturation de la transferrine (TSAT) dans des prélèvements de vitré et de LSR chez des patients opérés de DR rhéomatogène par vitrectomie, et chez des patients témoins opérés par vitrectomie pour trou maculaire ou membrane épirétiniennne, sans DR. Le taux de fer et le TSAT dans le vitré étaient significativement plus élevés chez les patients atteints de DR, que chez les patients témoins. Des niveaux plus élevés de fer dans le LSR étaient corrélés à une plus longue durée du DR, et à une récupération visuelle plus faible estimée à un mois post-opératoire.

Dans un second temps, nous avons établi un modèle *ex vivo* de DR en plaçant en culture des rétines de souris transgéniques (TG) exprimant la transferrine humaine, ou de souris *wild type* (WT), dans des conditions de surcharge en fer. Nous avons également ajouté la transferrine humaine à des rétines de rats en culture exposées à une surcharge en fer. Des marqueurs d'apoptose, de nécroptose et du stress oxydatif ont été ensuite évalués. Les explants de rétine de souris TG montraient moins de signes de dégénération que ceux provenant de souris WT. Notamment, le nombre de cônes et la longueur des segments des photorécepteurs étaient significativement supérieurs dans les explants de souris TG que de souris WT. De même, les marqueurs de mort cellulaire et de stress oxydant étaient significativement réduits dans les explants de souris TG, par rapport aux souris WT. De plus, le traitement des explants de rétine

de rat par transferrine a également conduit à une majeure préservation du nombre de cônes et une diminution des marqueurs de mort cellulaire (RIP kinase, cellules TUNEL-positives), de stress oxydant (4-HNE and 8-HGN) et d'inflammation (activation des macrophages/microglie et des cellules de Müller), par rapport aux explants de rats témoins non traités.

Nous avons également étudié l'effet neuroprotecteur de la transferrine dans un modèle *in vivo* de DR induit de manière expérimentale chez des souris TG et WT. Il a été constaté une meilleure préservation de la rétine chez les souris TG par rapport aux souris WT, notamment au niveau de l'épaisseur de la couche nucléaire externe, le nombre de cônes et la longueur des segments externes des photorécepteurs. De plus, des marqueurs d'apoptose (caspase 8, cellules TUNEL-positives), de nécrose (RIP kinase) ainsi que l'activation de cellules de Müller étaient significativement réduits dans les rétines de souris TG par rapport aux souris WT. Nous avons également utilisé une approche de séquençage d'ARN de rétines TG et WT 4 jours après l'induction du DR pour explorer les voies impliquées dans les effets neuroprotecteurs de la transferrine. Cette stratégie a permis d'identifier 412 gènes régulés de manière différentielle entre les souris TG et les souris WT, parmi lesquels 2 gènes (*Tfrc* et *Igfbp3*) codaient pour des protéines avec des interactions directes avec la transferrine. L'expression du gène *Igfbp3* (*Insulin-like growth factor binding protein 3*) était significativement augmentée dans la rétine de souris TG par rapport au WT, ainsi que le niveau de la protéine Igfbp3, confirmé par WB.

Finalement, des injections intravitréennes d'apo-transferrine humaine ont été effectuées chez des rats après induction d'un DR et afin de déterminer le potentiel de la transferrine en tant que traitement adjuvant à la chirurgie. Il existait une préservation plus importante des photorécepteurs (épaisseur de la couche nucléaire externe et longueur des segments externes des photorécepteurs), et une diminution significative de l'œdème rétinien dans le groupe traité.

En conclusion, cette étude a permis de démontrer que :

- le fer et le pourcentage de saturation de la transferrine sont augmentés dans les liquides oculaires chez les patients atteints de DR, et sont corrélés à une plus faible récupération visuelle à un mois post opératoire.
- la transferrine, surexprimée chez des souris TG ou administrée comme traitement externe, dans des modèles *ex vivo* ou *in vivo* de DR, diminue la nécrose et l'apoptose des photorécepteurs induites par le fer, ainsi que le stress oxydant et l'inflammation, préservant ainsi la structure rétinienne après DR.
- la transferrine exerce ces effets neuroprotecteurs non seulement à travers la régulation de l'homéostasie du fer, mais aussi par activation de la voie Igfbp3.

Ces résultats offrent une perspective de traitement adjuvant neuroprotecteur par transferrine dans le DR.

Note : Ce travail a fait l'objet de deux présentations orales :

- Congrès Euretina, dans le cadre du YOURS (*Young Retina Specialists*), Paris, France. Septembre, 2019.
- Congrès de la SFO (Société Française d'Ophtalmologie), dans cadre de la SFR (Société Française de Rétine), Paris, France. Mai, 2018

NEUROSCIENCE

Iron is neurotoxic in retinal detachment and transferrin confers neuroprotection

Alejandra Daruich^{1,2,3}, Quentin Le Rouzic¹, Laurent Jonet¹, Marie-Christine Naud¹, Laura Kowalczyk², Jean-Antoine Pournaras², Jeffrey H. Boatright^{4,5}, Aurélien Thomas^{6,7}, Natacha Turck^{7,8}, Alexandre Moulin², Francine Behar-Cohen^{1,7,9,*†}, Emilie Picard^{1*}

In retinal detachment (RD), photoreceptor death and permanent vision loss are caused by neurosensory retina separating from the retinal pigment epithelium because of subretinal fluid (SRF), and successful surgical reattachment is not predictive of total visual recovery. As retinal iron overload exacerbates cell death in retinal diseases, we assessed iron as a predictive marker and therapeutic target for RD. In the vitreous and SRF from patients with RD, we measured increased iron and transferrin (TF) saturation that is correlated with poor visual recovery. In *ex vivo* and *in vivo* RD models, iron induces immediate necrosis and delayed apoptosis. We demonstrate that TF decreases both apoptosis and necroptosis induced by RD, and using RNA sequencing, pathways mediating the neuroprotective effects of TF are identified. Since toxic iron accumulates in RD, we propose TF supplementation as an adjunctive therapy to surgery for improving the visual outcomes of patients with RD.

INTRODUCTION

Retinal detachment (RD) is an ocular emergency, as separation of the neuroretina from the underlying retinal pigment epithelium (RPE) (Fig. 1A, arrowhead) disturbs photoreceptor (PR) metabolism, causing PR death and subsequent vision loss (1). In rhegmatogenous retinal detachment (RRD), a retinal tear (Fig. 1A, arrowhead) induces subretinal fluid (SRF) accumulation in a space formed between the neuroretina and the RPE. The incidence of adult RRD varies between 10 and 55 per 100,000 individuals per year, with higher occurrence in patients who also have myopia or pseudophakia (2). This incidence will likely rise with myopia increasing worldwide (3). Intraocular surgery is commonly used to repair RRD but must be realized rapidly after detachment, as the duration of macular detachment is one of the major visual prognosis factors (4). The principles of surgery are based on retinal break closure (i.e., by laser therapy or cryotherapy) and internal or external temporary tamponade to maintain the retina attached during wound healing. When the procedure is performed internally, vitreous is removed and SRF is eventually extracted. Despite tremendous progress made in surgical techniques and the high repair rate, 60% of patients with RRD involving the macula (macula-OFF RD, 50% of the cases) recover less than 20/40 vision (4) and have poor vision-related quality of life (5). Improving vision after RD surgery is thus a critical therapeutic challenge.

Experimental models of RD correlate well with human pathology, making them appropriate to study mechanisms and pharmacothera-

peutic strategies. First changes are observed at the RPE/PR interface (6), followed by PR cell death that peaks at 2 to 3 days through apoptosis, necrosis, and autophagic cell death mechanisms (1). Caspase inhibitors do not prevent cell death in RRD models but rather promote receptor-interacting protein (RIP) kinase-dependent necrosis, referred to as necroptosis (7). Subsequent inflammatory reactions, including macrophage/microglial activation, contribute to a neurotoxic environment and to subsequent gliosis (8). Factors initiating cell death during RD remain undetermined, and the identification of a common target of the different death mechanisms is mandatory for developing an effective neuroprotective strategy for RD.

Iron is an important biological component for catalyzing enzymatic reactions, but when it is poorly liganded, iron generates reactive oxygen species, damaging cellular components (9). Iron-mediated retinal cell death has been suspected to occur in various forms of retinal degeneration (10), including age-related macular degeneration (AMD) (10), the leading cause of blindness in developed countries, but no correlation between iron and visual function was possible, and the iron sequestration capacity in human ocular fluids has never been evaluated in relation to retinal diseases. The control of ocular iron homeostasis is tightly controlled by retinal cell proteins, and the iron transporter, transferrin (TF), is one major protein found in the vitreous. We previously showed that the sequestration of two ferric iron ions by TF (11) prevents the formation of free radical-mediated stress and glial retinal cell death in culture. Our previous studies also showed, in various animal models, that treatment with TF exerted retinal neuroprotective effects through the reduction of apoptosis, inflammation, and oxidative stress (12, 13). However, the molecular mediators and pathways involved in the protective effects of TF have never been investigated in depth.

In our study, we evaluated the iron and TF status in ocular fluids from patients with RRD and correlated those parameters to visual acuity recovery and duration of RRD. Retinal explants are a common tool used for RD studies, recapitulating pathological processes found in the detached retina (14). Thus, we established an *ex vivo* model of RRD by placing rodent retinas under iron overload culture conditions and investigated whether TF protects the retina by evaluating apoptosis, necroptosis, and oxidative stress cell markers.

¹INSERM, UMRS1138, Team 17, From physiopathology of ocular diseases to clinical development, Université Sorbonne Paris Cité, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France. ²Department of ophthalmology, University of Lausanne, Jules-Gonin Eye Hospital, Fondation Asile des Aveugles, Lausanne, Switzerland. ³Ophthalmology Department, Necker-Enfants Malades University Hospital, AP-HP, Paris, France. ⁴Department of Ophthalmology, School of Medicine, Emory University, Atlanta, GA, USA. ⁵Center of Excellence, Atlanta Veterans Administration Medical Center, Decatur, GA, USA. ⁶Geneva University Hospitals, Unit of Toxicology, CURML, Geneva, Switzerland. ⁷Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Rue du Bugnon 21, 1011 Lausanne, Switzerland. ⁸Geneva University Hospital, AP-HP, Paris, France. ⁹Ophthalmopole, Cochin Hospital, AP-HP, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, 24 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. Email: francine.behar@gmail.com

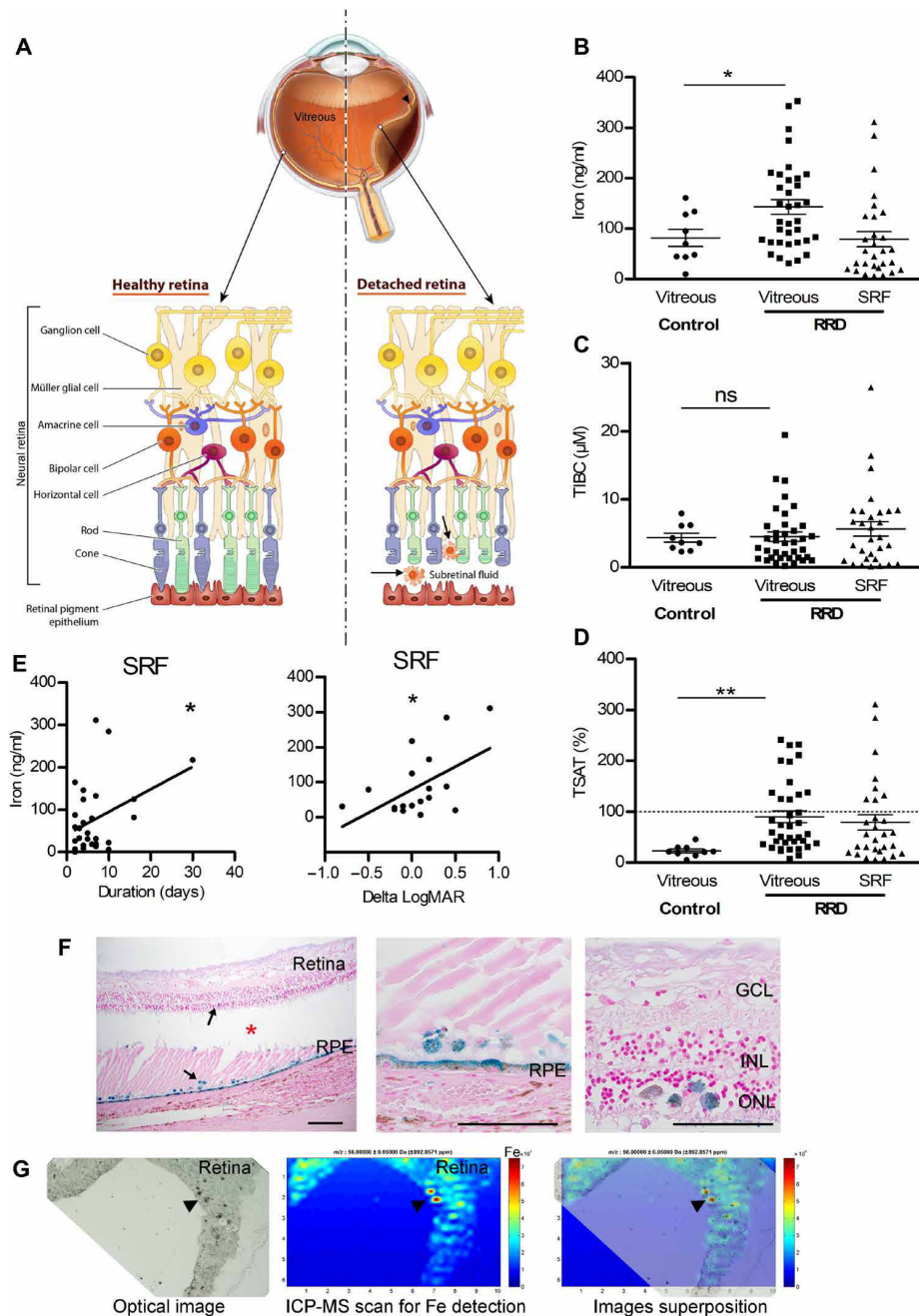


Fig. 1. Iron accumulates during RD in humans. (A) Schematic representation of RRD. RPE strictly interacted with PRs (rods and cones), supporting their function and maintaining retinal physiology. During RRD, separation of the neural retina from the RPE disrupts the metabolism of PRs and induces permanent cellular damage, SRF accumulation through the retinal tear (arrowhead), and inflammatory cells in subretinal space. (B to D) Iron level (B), total iron binding capacity (TIBC) (C), and transferrin saturation (TSAT) (D) were quantified in vitreous from control patients and in vitreous and SRF from patients with RRD. Unpaired *t* test ($n = 9$ to 35 for vitreous and $n = 30$ for SRF), * $P = 0.046$ and ** $P = 0.006$. ns, not significant. (E) Iron level in SRF was correlated to duration of the RRD ($n = 30$) and to the visual recovery 1 month following surgical treatment ($n = 10$). Pearson correlation test, * $P < 0.05$. (F) Perl's staining (blue) on retinal sections from patients with nonhemorrhagic RD (asterisk shows space between retina and underlying RPE) revealed iron deposits in the retina and the RPE (arrows). Scale bars, 500 μm. (G) Iron distribution map realized by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) on the retina from a patient with nonhemorrhagic RD revealed iron deposits (arrowheads). An optical image of the analyzed retina section (left), the corresponding ICP-MS image of Fe distribution (medium), and the superposition of both (right). The color spectrum represents an ion intensity map of Fe. GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer; m/z , mass/charge ratio; ppm, parts per million. All values are represented as the mean \pm SEM.

Transgenic mice expressing human TF (hTF) in the retina were used to observe TF neuroprotective efficiency in an experimentally induced RD model (15), and an RNA sequencing (RNA-seq) approach was used to explore the pathways implied in these effects. Intravitreal injection of TF in rats following experimental RD was used to determine the potential of TF as an adjuvant for RD surgery.

RESULTS

In ocular fluids from patients with RRD, iron increases with detachment duration and correlates with poor visual recovery

Total iron, TF, total iron binding capacity (TIBC), and percentage of transferrin saturation (TSAT) were evaluated in undiluted vitreous and SRF collected from patients with RRD (age, 64.3 years; SD, 9.6; 11 females and 24 males; $n = 35$) and from control patients (age, 70.2 years; SD, 9.5; 5 females and 4 males; $n = 9$). In the vitreous, the level of iron was significantly higher in patients with RRD as compared to control subjects without RD (143.1 ± 14.4 ng/ml versus 81.7 ± 16.8 ng/ml; $P = 0.046$) (Fig. 1B). The TIBC values did not differ in eyes with or without RRD (4.5 ± 0.7 and 4.3 ± 0.6 μ M TF; $P > 0.5$), but TSAT increased from $22.8 \pm 3.8\%$ in control eyes to $89.91 \pm 11.4\%$ in eyes with RRD, reaching almost complete saturation ($P = 0.006$; Fig. 1, C and D). In the SRF, the high rate of TSAT ($53.5 \pm 12.6\%$) (Fig. 1D) also reflected iron overload. Higher levels of iron in the SRF were associated with longer duration of detachment ($P = 0.038$; Fig. 1E, left graph) and correlated with lower visual recovery 1 month after surgery ($P = 0.047$; Fig. 1E, right graph). Because the data are correlative, these results suggest that iron toxicity could contribute to the functional outcome in RRD.

Iron deposits, evaluated in postmortem ocular tissue sections of RD, were found in the remaining PR layer, inside cells in the subretinal space that are very likely to be inflammatory cells (arrows), and in RPE (Fig. 1F) using Perl's staining. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) analysis confirmed elevated iron content throughout the retina sections (Fig. 1G, green), with higher concentrations in focal areas (red, arrowheads). These observations suggest that iron could mediate, at least partially, PR damage during RRD.

Iron induces PR death in rat retinal explants ex vivo

To evaluate iron neurotoxicity, rat neural retina explants were cultured in low-serum medium, and PR cells were immediately exposed to iron at a range of concentrations similar to those measured in SRF from patients with RRD. After 2 days of exposure to 1 mM FeSO_4 (fig. S1A), no increase in caspase-dependent apoptosis was observed [caspase 3 activation and TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling)-positive cells were similar under control and iron conditions] (fig. S1, B and C). However, lactate dehydrogenase (LDH) release, an early marker of necrosis, was concentration-dependently increased as early as 1 day after iron overload exposure (fig. S1D). After 2 days of iron overload, necroptosis was confirmed with an increase of RIP kinase protein expression and staining of PR nuclei with propidium iodide (fig. S1, E and F). The 2 days of iron exposure led to the loss of both rod and cone PRs, as shown by the decreased rhodopsin protein level with increasing concentration of FeSO_4 (Fig. 2B) and nearly no arrestin-positive cones remaining after 1 mM FeSO_4 exposure

(Fig. 2C, arrows). After iron overload, progressive histological damage appeared over time, leading to complete retinal layer disorganization and shortening of the residual PR segments (Fig. 2D), iron diffusely stained the retinal explants 7 days after iron removal, particularly in the remaining PR segments, and was concentrated in inflammatory cell types (brown, arrows), as observed in human RD sections (Fig. 2E). The direct contact of iron with PR led to immediate necroptosis that increased with higher iron concentrations and with longer iron exposure times.

TF protects against iron-induced toxicity in ex vivo mouse and rat retinal explants

In transgenic (TG) mice expressing hTF in retinal cells (11), hTF levels increased in the medium with the duration of retinal explant culture (fig. S2, A to C). TG-derived explants exhibited fewer signs of degeneration and oxidative stress in low-serum medium compared with wild-type (WT) explants. After 6 days of culture, retinal glial Müller cell activation, identified by glial fibrillary acidic protein (GFAP) distribution (fig. S2D, arrow) (16), and markers of oxidative stress [8-hydroxyguanosine (8-HGN) and 4-hydroxynonenal (4-HNE)] (fig. S2, E and F) were reduced in retinal explants from TG mice compared with those from WT mice.

Subsequently, we investigated whether TF was protective against iron overload combined with RD. Iron overload conditions were applied to TG and WT retinal explants (Fig. 3A). LDH release, evaluated after 1 day, was reduced by 24.4% in retinal explants from TG mice as compared with explants from WT mice ($P = 0.03$; Fig. 3B). After 6 days of iron exposure, the number of cones was 55.5% higher and the outer segment (OS) lengths were 58.2% longer in retinas from TG mice as compared with WT ($P < 0.0001$ for both; Fig. 3C). In addition, reduced Müller glial cell activation and oxidative stress markers (fig. S3, A to C) were observed in retinal explants from TG mice. The expression of hTF in TG mice retinas reduced iron accumulation as indicated by a reduction in ferritin light chain (Lft) staining (Fig. 3D) (12). The TG mouse retinas were thus protected from iron-induced oxidative stress and necroptosis.

We then evaluated the effect of TF added to rat retinal explants after 2 days of iron exposure to more closely mimic the therapeutic time course common in human RD treatment. After 2 days, iron was removed and exogenous hTF (50 mg/ml) was added in the medium (Fig. 3E). TF treatment rescued not only rod-specific protein [61.7% greater rhodopsin level ($P = 0.021$); Fig. 3F] and the lengths of rod OSs (Fig. 3G, asterisk) but also cones [83.8% greater number of cones versus untreated ($P = 0.04$); Fig. 3G, arrows]. Two days after iron exposure, the RIP kinase protein level remained elevated, but the presence of the cleaved form of RIP kinase proteins (Fig. 3H) suggested an activation of caspase 8, leading to a delayed activation of apoptosis (7). Treatment with hTF significantly reduced the level of cleaved RIP kinase by 76.1% ($P = 0.028$; Fig. 3H), increased the antiapoptotic protein Bcl2 by 83.3% ($P = 0.028$; Fig. 3I), and reduced the number of TUNEL-positive cells (Fig. 3J). As expected, Lft staining intensity was reduced (Fig. 3K), in parallel to the reduction of iron deposits in the retina. Exogenous hTF prevented the activation of resident macrophages/microglial cells (fig. S4A, CD68, arrowheads) and decreased Müller glial cell activation (fig. S4B, GFAP, arrows). The iron-induced oxidative stress markers 4-HNE and 8-HGN were also decreased with hTF treatment (fig. S4, C and D). Together, these results demonstrate that treatment with exogenous TF efficiently protects the retina from two types of iron-induced toxicity:

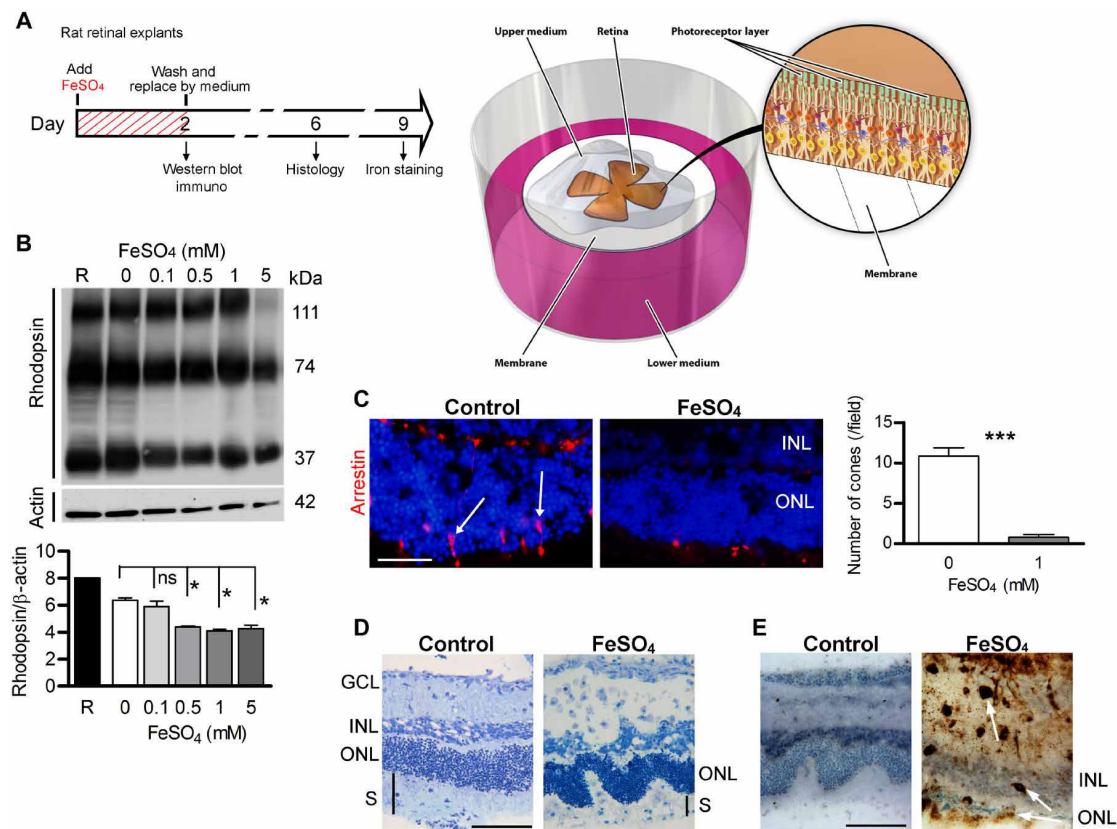


Fig. 2. Iron toxicity for PRs in rat retinal explants. (A) Illustration of the retinal explant model and the timed workflow for iron exposure protocol: Adult rat retinas were dissected, placed on membranes with PRs facing up, and immediately exposed for 2 days to iron (FeSO₄). Control explants were cultured with medium alone. Some explants were harvested, and Western blotting and immunostaining were performed. Afterward, the medium was completely replaced, and explants were maintained in culture for 4 or 7 days for histological analysis and iron staining, respectively. (B) Western blotting and quantitative analysis of a rod protein showed a decreased rhodopsin level in explants exposed to increasing concentrations of FeSO₄. The molecular masses of the immunolabeled fragments were indicated in the right margin. Mann-Whitney test ($n = 3$, $*P = 0.028$). (C) Immunostaining of arrestin (red, arrows) and subsequent quantification showed very few cones present in explants exposed to 1 mM FeSO₄. Mann-Whitney test ($n = 3$, $***P < 0.0001$). (D) Semithin sections of explants showed disorganization of the ONL and segments after 1 mM FeSO₄ exposure. (E) 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) amplified Perl's reaction revealed iron deposits (arrows) in explants exposed to 1 mM FeSO₄. GCL, ganglion cell layer; ONL, outer nuclear layer; INL, inner nuclear layer; S, segments. Scale bars, 100 μ m. All values are represented as the mean \pm SEM.

direct and early necroptosis and delayed apoptosis that could result from secondary iron-related effects.

TF rescues the detached mouse retina in vivo

We induced partial RD in mice and rats (about 50 to 70% and 30 to 50% of the retinal surface, respectively). After 7 days, the detached retina was thickened, the outer nuclear layer (ONL) was disorganized, PR nuclei were pyknotic, OSs were absent, and RPE cells were enlarged in the detached area (fig. S5). Similar to human RD, iron accumulated in the detached rodent outer retinas (fig. S6, A and B) and in rat ocular fluids (52.54% increase in total iron levels after 14 days of detachment; $P = 0.042$) (fig. S6C). In TG mice (Fig. 4), hTF protected the detached retina from edematous thickening [21.7% decrease in retinal thickness of the detached retina/nondetached retina ($P = 0.045$), designated by brackets in Fig. 4A and quantified in the left graph of Fig. 4B] and from ONL thinning [20.3% decrease ($P = 0.033$); Fig. 4B, right graph] and prevented PR OS shortening [50% decrease ($P = 0.047$); graph in Fig. 4C and arrowheads in Fig. 4 (A and C)]. TG-detached retinas had 311.3% more cones than WT ($P = 0.025$; Fig. 4D). Activation of Müller glial cells

was significantly reduced in TG mouse retinas (Fig. 4E, arrows). Compared with WT retinas, hTF expressed in TG retinas decreased *caspase 8* mRNA expression by 48.9% ($P = 0.008$), the level of the cleaved form of caspase 3 protein by 57.1% ($P = 0.03$), and the number of TUNEL-positive cells in the ONL of detached retinas by 56.3% ($P = 0.03$), demonstrating the antiapoptotic effect of TF in the mouse RD model (Fig. 4F). RIP kinase protein levels were reduced by 35.4% in the TG-detached retina compared with the WT ($P = 0.03$) (Fig. 4G), suggesting that hTF reduced both apoptotic and necrotic cell death in the mouse RD model.

Molecular signature of hTF overexpression in the mouse RD model

We performed a genome-wide analysis (RNA-seq) of neural retinas from TG and WT mice 4 days after induction of RD. From a total of 412 genes differentially regulated between TG and WT mice (1.5-fold change; $P \leq 0.05$), 149 were up-regulated and 263 were down-regulated. An extensive list is provided in data file S1. The 20 most up- and down-regulated genes are listed in table S1. Gene ontology (GO) (biological process, molecular function, and cellular compartment

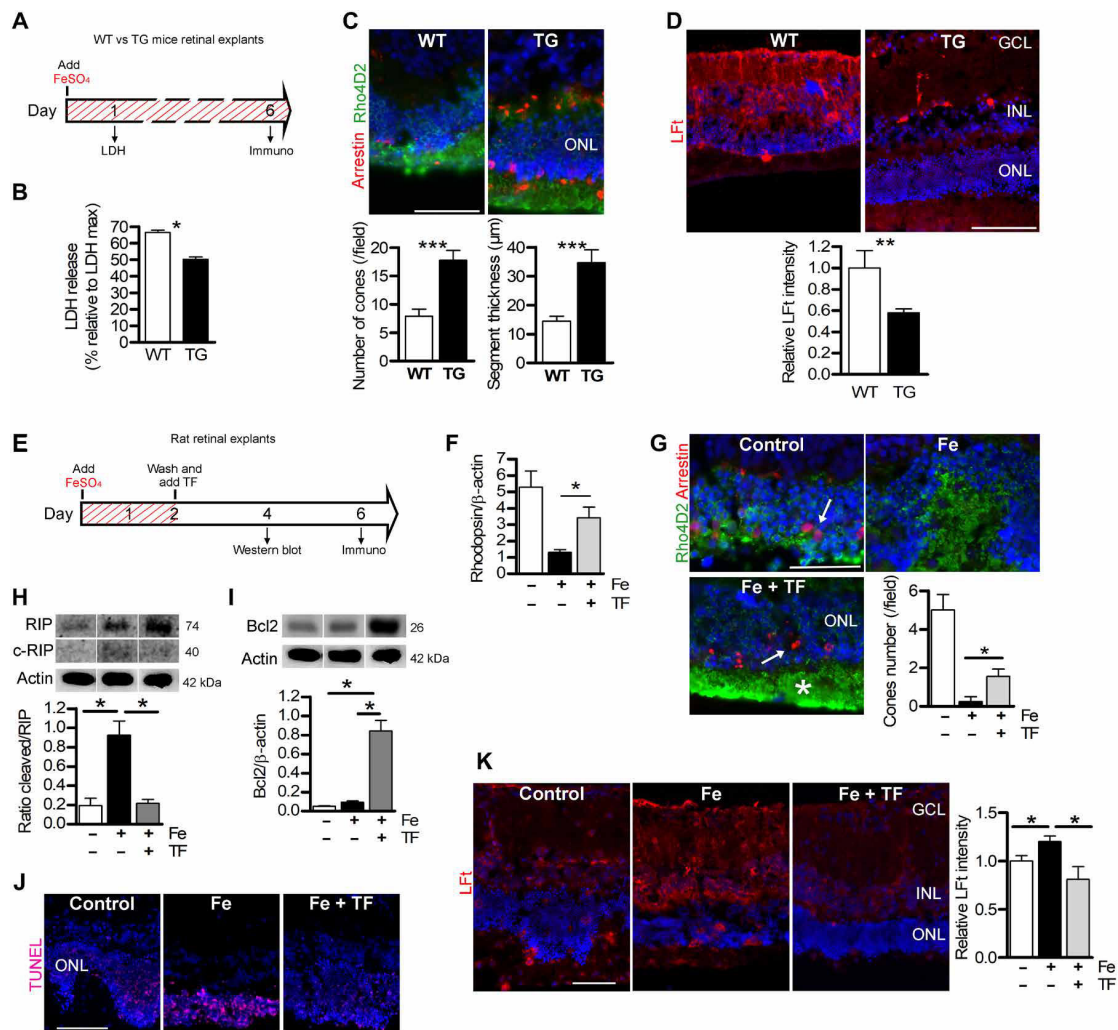


Fig. 3. Expression of TF protects retina explants exposed to iron. (A) Illustration of timed workflow for retinal explants from WT and TG mice expressing hTF continuously exposed to 1 mM FeSO₄. LDH release was measured after 1 day and immunostaining after 6 days. (B) LDH release was lower in culture medium from TG explanted mice compared to WT explants. Mann-Whitney test ($n = 6$), $*P = 0.03$. (C) Number of cones stained by arrestin (arrow) and length of rod segments stained by rhodopsin (Rho4D2) were quantified and were higher in TG explants. Mann-Whitney test ($n = 3$), $***P < 0.001$. (D) Quantification of immunostaining intensity for markers of iron storage LFT was decreased in TG explants compared with WT explants. Mann-Whitney test ($n = 3$), $***P < 0.01$. (E) Illustration of timed workflow for TF treatment on iron-exposed explants: Adult rat retinas were exposed for 2 days with 1 mM FeSO₄. Control explants were cultured with medium alone. Afterward, the medium was completely replaced and explants were treated with hTF (50 mg/ml) for 2 or 4 days. (F) Quantitative analysis of rhodopsin protein by Western blotting show increased rhodopsin protein expression in TF-treated iron-exposed explants (Fe + TF). Mann-Whitney test ($n = 3$), $*P = 0.021$. (G) Rhodopsin and arrestin immunostaining revealed protection of rod segments (Rho4D2, asterisk) and cones (arrow) by TF treatment (Fe + TF). Quantification of cone nuclei showed more cones in explants treated with TF than those exposed to FeSO₄. Mann-Whitney test ($n = 3$), $*P = 0.036$. (H) Western blotting and quantitative analysis of RIP kinase demonstrated higher full form and cleaved form of the proteins in iron-exposed retinal explants. The cleaved form of RIP reported on RIP full form was reduced when TF was used to treat iron-exposed explants. Mann-Whitney test ($n = 3$), $*P = 0.028$. (I) Antiapoptotic Bcl2 protein, detected by Western blotting, was increased in TF-treated iron-exposed explants. Mann-Whitney test ($n = 3$), $*P = 0.028$. (J) TUNEL-positive cells in the ONL were reduced by TF treatment. (K) Immunostaining of iron storage marker ferritin light chain was significantly lower in explants treated with TF (Fe + TF) than without treatment (Fe). Fluorescence intensity was reported relative to control conditions. One-way analysis of variance (ANOVA), Bonferroni post test ($n = 3$), $*P < 0.05$. Scale bars, 100 μm. All values are represented as mean ± SEM.

categories) and reactome pathway enrichment analysis demonstrated significantly affected categories in genes down-regulated or up-regulated in TG mice as compared with WT (Fig. 5; see data file S1 for details). We regrouped the significantly enriched pathways into 10 groups according to their biological functions: retina homeostasis, neurological process, phagocytosis, immune system, remodeling of extracellular matrix (ECM), mechanisms of cell death, metabolism,

DNA/RNA regulation, intracellular signaling, and others, which comprise other biological functions such as cellular proliferation and differentiation (Fig. 5). The retina homeostasis group was solely composed with the most significantly enriched GO term “photoreceptor cell maintenance,” which included genes related to the connector cilium linking the inner segment (IS) to the OS and playing a major role in rhodopsin transport toward OS disks. Pathways

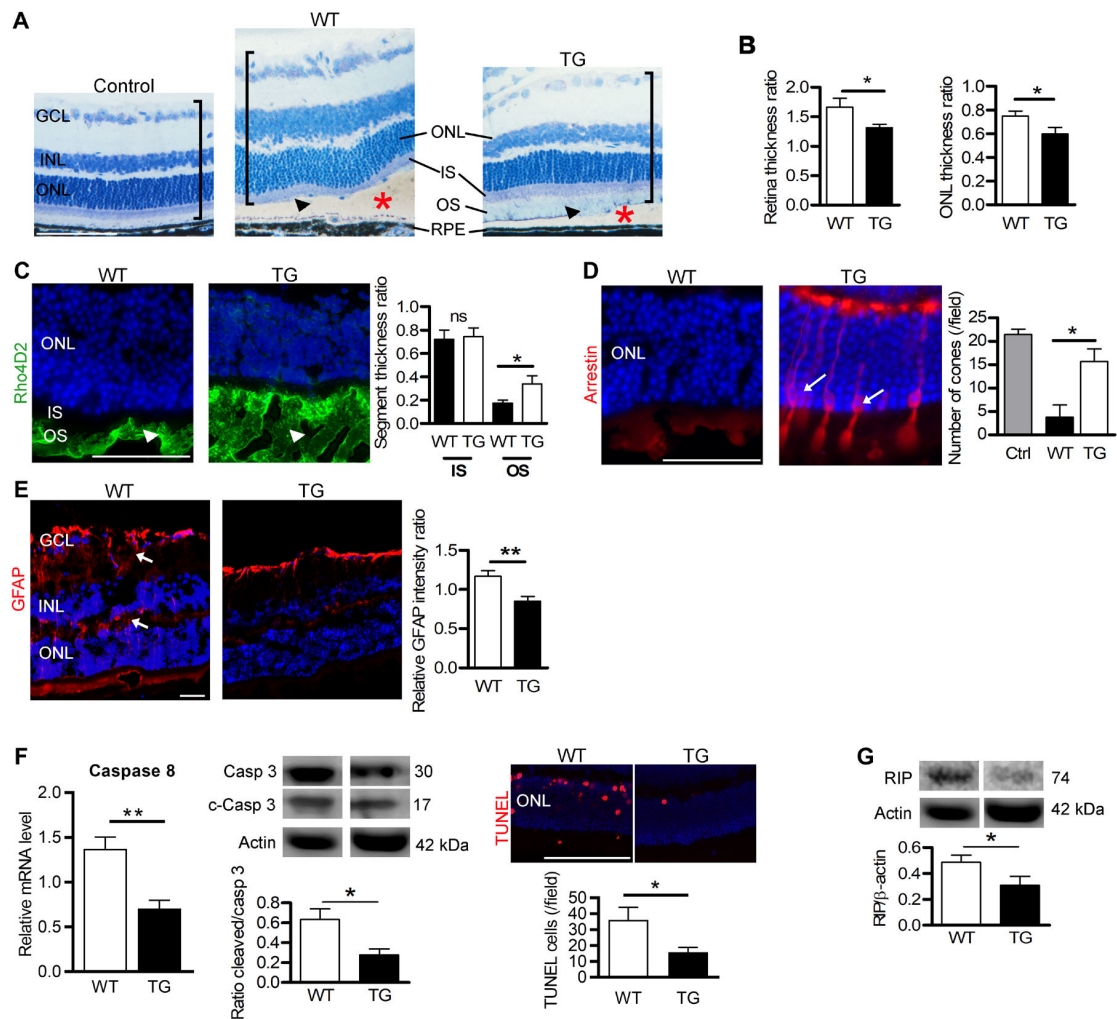


Fig. 4. TF expression preserves the detached retina in mice. (A) Semithin retinal sections from control WT mice without RD and WT and TG mice expressing hTF 7 days after RD (red asterisks). In TG mice, the histology of the detached retina (brackets) was less disrupted than in WT mice, with remaining OS (arrowheads). Nuclei were stained with toluidine blue. Measurements of total retinal thickness in the detached area were reported to undetached retina thickness. (B) Expression of hTF in mice (TG) reduced thickening of the total retina and ONL. Mann-Whitney test ($n = 5$), $*P < 0.05$. (C) Rhodopsin staining in OS was conserved in TG compared with WT mice (arrowheads) 7 days after RD. The length of OS measured on semithin sections was higher in TG mice compared with WT mice. Mann-Whitney test ($n = 6$), $*P = 0.047$. (D) Arrestin staining revealed cones in retinal sections of TG mice (arrows) 7 days after RD. Cone number was higher in TG compared with WT mice. Mann-Whitney test ($n = 6$), $*P = 0.025$. (E) Müller glial cell activation revealed by GFAP expression was lower in TG mice compared with WT mice (arrows). Mann-Whitney test ($n = 5$), $**P = 0.0056$. (F) Cellular markers of apoptosis were lower in TG compared to WT mouse retinas. Caspase 8 mRNA level by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), and the ratio of cleaved/pro-caspase 3 protein levels was determined by Western blotting performed 4 days after RD. TUNEL staining was performed in eyes collected 7 days after RD. Mann-Whitney test ($n = 5$), $**P = 0.008$ and $*P = 0.028$. (G) Necrotic RIP kinase protein level, detected by Western blotting, was reduced in TG mice compared with WT mice. Mann-Whitney test ($n = 3$), $*P = 0.028$. IS, inner segment. Scale bars, 100 μm (A, E, and F) and 50 μm (C and D). All values are represented as the mean \pm SEM.

relative to the neurological process group were especially involved in the regulation of neuron development and cognition. The phagocytosis group was composed of the most significant biological process according to the reactome analysis (“endoplasmic reticulum-phagosome pathway”) that was also represented in GO analysis associated with the “receptor-mediated endocytosis” and the “regulation of vesicle fusion” pathways. The GO molecular function analysis revealed that “binding” was the most significantly enriched term (16 of a total of 29 terms) (data file S1). Furthermore, of the top 20 up- and down-regulated genes, half were associated with “protein binding” molecular function (GO term classification) (table S1). Pathways

regrouped in the immune system group were also highly represented in the two enrichment analyses, and genes included in those were mostly up-regulated. Pathways related to the mechanism of cell death group were represented by two GO biological process terms involved in the regulation of apoptotic processes. In the 40 most significantly regulated genes, 12 were implied in cell death processes (table S1). The GO analysis of the cellular components showed 19 significant enrichments, which can be regrouped into three equal cellular compartments: the nucleus, the cytoplasm, and membranes (data file S1), reflecting cross-talk between the cell membrane and the nucleus.

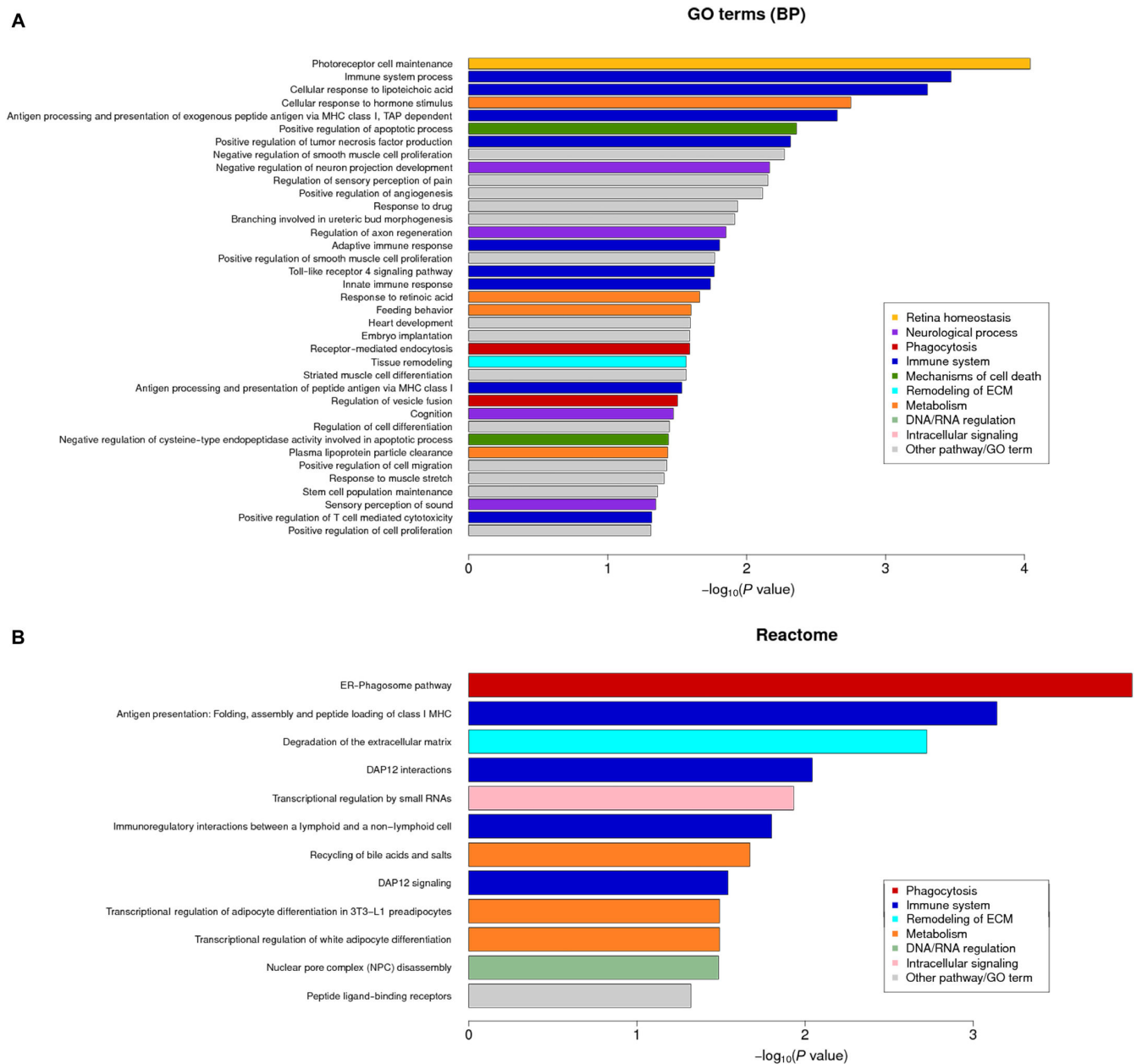


Fig. 5. High-throughput analyses of the transcriptome of TG mouse retinas following RD. Overrepresentation pathway analysis using GO terms enrichment (biological process clustering) (A) and reactome biosource (B). Color codes were used to associate pathways with common biological effects. Comparative analyses were carried out in TG versus WT retinas 4 days after RD ($n = 4$). GO terms and pathways were considered as enriched if fold enrichment is ≥ 2.0 , uncorrected P value is ≤ 0.05 , and the minimum number of regulated genes in pathway/term is ≥ 2.0 . MHC, major histocompatibility complex; ER, endoplasmic reticulum.

Among the 412 genes differentially regulated between TG and WT mice, 2 genes (*Tfrc* and *Igfbp3*) encode proteins with direct interactions with TF (17). The insulin-like growth factor binding protein 3 (*Igfbp3*) transcript was significantly increased in TG mouse retina compared with WT 4 days after RD induction (fold change: 3.27, $P = 0.086$; table S1). In the normal retina, the IGFBP3 protein was localized in PR segments (arrowhead) in retinal capillaries and in the outer plexiform layer (arrow) (fig. S7A). Western blot analysis con-

firmed an increase of 46.7% of IGFBP3 protein level in the retinas of TG mice compared with WT mice 7 days after RD ($P = 0.028$; fig. S7B).

Local ocular injection of TF preserves detached rat retinas in vivo

In a therapeutic perspective trial, intravitreal injection of hTF (50 mg/ml) showed protective effects in a rat RD model (Fig. 6A). The retinal thickness of the detached retina/nondetached retina (Fig. 6A,

brackets, and Fig 6B, upper graph) was 14.2% lower in TF-treated rats ($P = 0.003$), whereas the ONL thickness was preserved [30.6% reduction ($P = 0.013$); Fig. 6B, middle graph], and immunostaining of rod and cone PRs (Fig. 6C) revealed preserved morphology. There was a 37.6% reduction of OS length (Fig. 6, B and C, arrowhead) in balanced salt solution (BSS) RD rats compared to TF-treated rats ($P = 0.004$; Fig. 6B, lower graph). Therapeutic TF thus reduced edema of the detached retina and preserved PR morphology. Together, these results indicate that TF, even if administered at the time of RD, can prevent further retinal alterations and cell death.

DISCUSSION

Iron accumulation–induced oxidative stress has been observed in neurodegenerative and retinal diseases (9) and causes rapid PR death (10), but no correlation between intraocular iron and visual function has been demonstrated in a human disease. In our study, we show in human eyes increased iron levels and TSAT in the vitreous and SRF fluid, reflecting the accumulation of free iron in ocular tissues (RPE, PRs, and inflammatory cell–like) upon RD. Our results confirmed previous analyses that demonstrate increased oxidative stress in vitreous from patients with RRD (18).

Increased iron following RD could result from a combination of factors. In physiologic conditions, retinal iron entry is actively controlled through TF uptake by its receptor at the RPE basal membrane that forms the outer retinal barrier. After detachment, acute RPE alteration (6) may favor free iron entry. Similarly, a breakdown of the inner blood–retinal barrier in an animal model of type 2 macular telangiectasia, a rare human disease, led to iron accumulation in the retina and PR degeneration (19). However, iron accumulation was also shown in retinal dystrophies, especially in PRs, without obvious barrier breakdowns (20), suggesting that other mechanisms contribute to iron increases. PRs and RPE have high iron content because iron is a cofactor in phototransduction enzymes and have a major role in iron retinal homeostasis by the synthesis of TF (20). RPE cells, through the phagocytosis of shed OSs, recycle iron and export it from the retina (20). During RD, the loss of contact between PR and RPE leads to intracellular iron accumulation, a mechanism described in the Royal College of Surgeons (RCS) dystrophic rat, a genetic model of defective OS phagocytosis (20). PRs are extremely sensitive to iron excess, but the exact mechanisms of this toxicity have not been fully determined. We used organotypic retinal cultures to show that direct contact with iron causes rapid PR necrosis. Peroxidation by iron of polyunsaturated fatty acids in the OSs could be one necrotic mechanism (21). Furthermore, when iron has accumulated in the retina explant and after its removal from medium, apoptotic cell death observed could result from intracellular molecular iron-induced oxidation through the Fenton/Haber-Weiss reaction cycle (DNA, RNA, lipids, and proteins) (9), as suggested by DNA breaks (8-HGN) and lipid peroxidation (4-HNE) (fig. S4). Thus, labile iron exerts deleterious extracellular and delayed intracellular effects. The fact that vision recovery in patients with RRD was inversely correlated with ocular iron levels suggests that iron toxicity could be one of the mechanisms of PR loss over the time course of RRD.

The observed fully saturated TF in ocular fluids and intracellular iron accumulation in the retina suggest that iron loading capacities are saturated. Therefore, the use of TF appears as a relevant therapeutic therapy. Chemical chelators (deferiprone, deferoxamine, or deferasirox) have already been evaluated in neurodegenerative diseases

after systemic administration (22). However, long-term iron chelation therapy, routinely used for instance in beta-thalassemia and chronic iron overload diseases, negatively affects patient's quality of life and induced ocular toxicity, including cataracts, maculopathy, and optic neuritis (23, 24). Thus, the use of these chemical chelators in patients with RD without systemic iron overload could be deleterious for the eye. Moreover, intraocular local administration of chemical iron chelators would require repeated intravitreal injections due to their short half-life (25). Such local administration might cause excessive intracellular iron depletion due to the high chelator-to-iron ratio.

On the basis of these findings, we proposed to use local ocular TF to neutralize iron toxicity. We previously showed that TF is safe for ocular use even at high doses and prevents iron accumulation in RPE and PRs, and that iron-loaded (holoTF) and iron-free TF egresses the retina through the TF receptor at the RPE apical side (12). Using various models of retinal degeneration, we have previously showed that apoTF has a neuroprotective effect (12, 13), but involved mechanisms have not been yet fully elucidated. Here, using two RD models, we confirmed that apoTF efficiently removes iron and exerts antioxidant and neuroprotective effects. However, recent studies have demonstrated that the blockade of apoptosis or necrosis was required to protect the detached retina (7). Using TG mice that express hTF in the retina or using therapeutic regimens with exogenous TF, we demonstrated that TF reduced both the direct iron-mediated necrosis through RIP kinase down-regulation and the delayed iron-induced apoptosis.

The biological effects of TF, present at high concentration in the normal vitreous, are not limited to iron metabolism, and the neuroprotective properties of TF result from numerous targeted pathways. Lesnikov *et al.* (26) previously demonstrated that upon binding to TF receptor 2 (TFR2), TF protected against Fas-induced cell death via the mitochondrial pathway by reducing BID cleavage, inhibiting caspase 3 and caspase 9 activations, and up-regulating survival signals such as Bcl-xL. The retinal transcriptome of TG RD mice compared with WT RD mice highlighted seven major groups of pathways regulated by TF: phagocytosis, immune systems, retina homeostasis, neurological process, remodeling of the ECM, mechanisms of cell death, and metabolism. TF up-regulated the expression of receptors involved in endocytosis (*Cd36*, *Cd14*, and *Siglech*) and down-regulated the expression of vesicle trafficking inhibitors (*Tbc1d14*, *Evi5*, *Tbc1d30*, and *Usp6nl*). As a cargo protein, TF facilitates endocytosis/phagocytosis (27) and vesicle trafficking (28). Among the numerous pathways involved in neuroprotection regulated by TF (table S2), the IGFBP3 pathway is of particular interest. The up-regulation of IGFBP3 by TF was confirmed at the protein level, and fig. S8 illustrates IGFBP3 pathways and the genes in this pathway that were up-regulated (red underlined) or down-regulated (green underlined) by TF. The main role of IGFBP3 is to regulate the various functions of IGFs (29). When iron levels are high, TF forms complexes with IGFBP3 (17), preventing binding to its receptors and subsequent apoptosis and growth inhibition (29). IGFBP3–TF complex internalization allows IGFBP3 to be released to cellular organelles (30) and mediates neuroprotective effects (see fig. S8 for more details) (29, 31, 32).

From the analysis of ocular fluids of patients with RRD, we have demonstrated the oversaturation of TF and iron overload in a human ocular disease. Despite a high TF concentration in the vitreous, iron accumulates in the retina in other human diseases as observed in AMD (10); thus, TF oversaturation could be a general mechanism

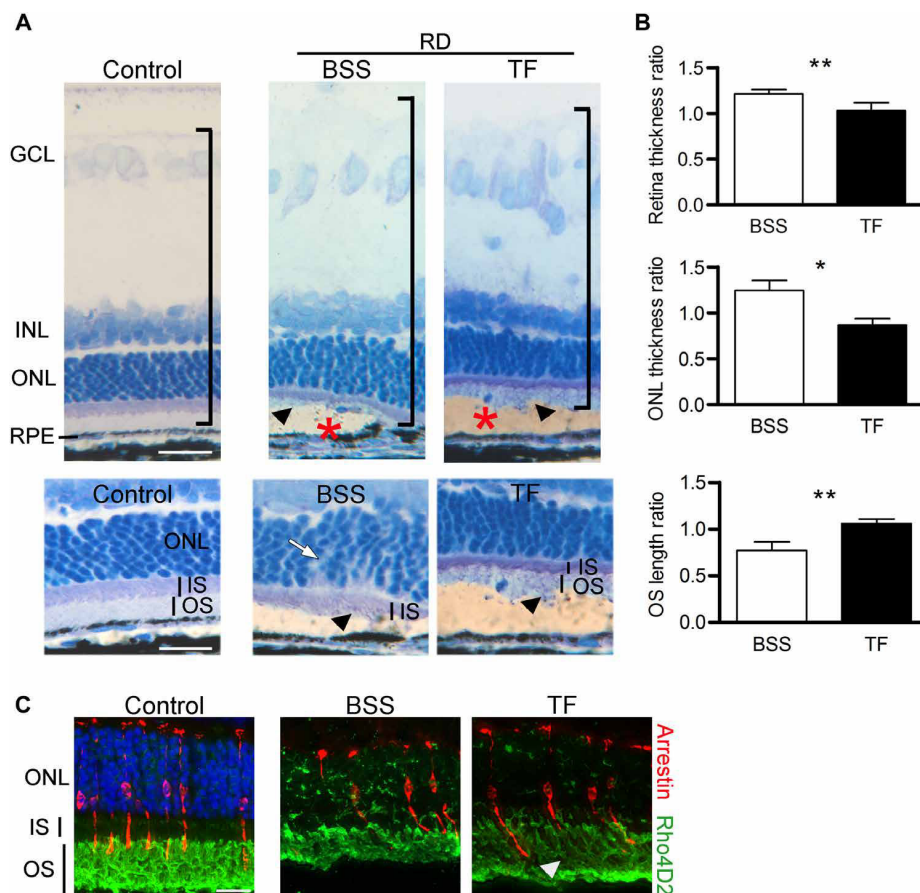


Fig. 6. Local administration of TF preserves neural retina in the rat model of RD. (A) Rat semithin retinal sections without RD (control) and with RD, treated by either intravitreal injection of a control solution [balanced salt solution (BSS)] or TF (50 mg/ml). Retinal histology in the detached area (asterisks) was more preserved in animals treated with TF compared with those receiving BSS. Higher magnifications showed less ONL disorganization (arrow) and longer OSs (arrowheads) in TF-treated RD rats. Nuclei were stained with toluidine blue. Measurements of thickness in detached retinas were reported relative to undetached retina thickness. (B) Treatment with TF reduced thickening of the total retina and the ONL. Mann-Whitney test ($n = 5$), $*P = 0.013$ and $**P \leq 0.01$. The length of OSs was higher in TF-injected RD rats. Mann-Whitney test ($n = 5$), $**P = 0.007$. (C) Rhodopsin (green) and arrestin (red) staining in rats 7 days after RD. OSs were preserved in TF-treated animals (arrowhead). Scale bars, 20 μm (A and C) and 50 μm [(A) high magnification]. All values are represented as the mean \pm SEM.

of PR cell death. Therefore, TF supplementation is a credible strategy for further translational clinical trials in eligible patients. As compared with other iron chelators, TF treatment not only restores iron homeostasis but also activates major neuroprotective pathways such as the IGF1R pathway. Future work elucidating the iron-unrelated pathways of TF will be required. We have used RD as a “model disease” in which neuroprotective treatments could show functional endpoints in a reasonable time frame. On the basis of the results obtained from experimental models and from human pathology and because TF is an endogenous molecule, clinical studies should be performed to evaluate TF in conjunction with RD surgery. Once validated, TF could be proposed as a treatment for other diseases associated with RD, such as in myopia, or those associated with iron overload such as AMD (10).

MATERIALS AND METHODS

Human samples

Consecutive patients presenting with RRD at Jules-Gonin Eye Hospital (Lausanne, Switzerland) from 1 December 2014 to 31 July

2015 were included according to the protocol approved by the ethics committee and diagnosed through normal standard clinical care at first examination. Upon presentation with RRD, the main inclusion criterion was the necessity of performing intraocular surgery to limit visual impairment in the absence of other ocular conditions. Among 44 vitreous samples, 35 samples were obtained from patients with macula-OFF RD. Nine sex-matched and age-matched patients presented with macular holes ($n = 4$) or with epiretinal membranes ($n = 5$), and no other ocular disease were included during the same period as control subjects for vitreous humor sampling.

Undiluted vitreous samples were collected by manual aspiration through a syringe connected to a 23-gauge vitrectomy cutter (before infusion opening; Alcon, Rotkreuz ZG, Switzerland). SRF was collected by active aspiration through a retinal tear (Advanced Back-flush DSP cannula, Alcon, Rotkreuz ZG, Switzerland). Samples were coded and stored in a biobank at -80°C until biochemical analysis.

Duration of RRD (mean: 6.7 ± 5.9 days) was defined as the time from the onset of symptoms to surgery. Visual acuities were recorded before and 1 month after surgery and converted to the logarithm of

the minimum angle of resolution (LogMAR). Visual recovery was defined as the difference between postoperative and preoperative LogMAR visual acuity.

Frozen human postmortem eye tissues (10 donors) with non-hemorrhagic RD retrieved from the pathological files of Jules-Gonin Eye Pathology Laboratory were used to stain iron by Perl's method. A block of tissue (1 to 1.5 cm long and 0.5 cm wide) containing the RD was processed as serial 5- μ m-thick paraffin sections.

Animals

Adult male Long-Evans rats (JANVIER LABS, Le Genest St Isle, France) ($n = 32$), adult male Wistar rats (JANVIER LABS) ($n = 21$), adult male C57BL6/J mice (WT) (JANVIER LABS) ($n = 40$), and adult male TG mice expressing human transferrin (TG) (Centre d'exploration fonctionnelle du Centre de Recherche des Cordeliers, UMRS1138, Paris France) ($n = 40$) were fed with a standard laboratory diet and ad libitum tap water in a room maintained at 21° to 23°C with a 12-hour light/12-hour dark cycle (6 a.m. to 6 p.m.). Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg; Virbac, Carros, France) and xylazine (12 mg/kg; Bayer, Lyon, France); rats were anesthetized with an intramuscular injection of ketamine (35 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg). All animals were sacrificed by carbon dioxide inhalation.

Surgical induction of RD in rodents and study design

Features of retinal degeneration secondary to detachment were observed in animal models in which the retina is mechanically detached by the subretinal injection of sodium hyaluronate. Once anesthetized, Long-Evans rats or WT and TG mice received topical anesthesia with a drop of 1% tetracaine (Faure, Europhtha Laboratories, Monaco). Pupil dilatation was achieved by dropwise instillation of 2 mg/0.4 ml mydriaticum (Théa Laboratories, Clermont-Ferrand, France) and 10% phenylephrine hydrochloride (Faure, Europhtha Laboratories). RD was induced by a subretinal injection of 10 μ l (mice) or 30 μ l (rats) of sodium hyaluronate (5 mg/ml; Healon, Uppsala, Sweden) under an operating microscope using a 34-gauge needle through the sclera for a total of 50 animals. The induced RD occupied approximately 30 to 70% of the fundus. Eyes with hemorrhagic complications were excluded (nearly 15%). Eyes receiving no injection were used as controls.

Intravitreal injection in rats was performed immediately after RD induction with 5 μ l of human apoTF solution (50 mg/ml in BSS; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin en Yvelines, France) or control solution (BSS), as previously described (12).

Fundus and spectral domain optical coherence tomography were simultaneously realized with a Micron III retinal imaging microscope (Phoenix Research Labs, Pleasanton, CA, USA) in anesthetized animals as previously described (12) before and after RD induction and 4 or 7 days later. At 4 days, some mouse eyes were collected for RNA-seq ($n = 4$ eyes per group). At 7 days, eyes from rats and mice were collected for histology and immunostaining ($n = 5$ and 7 per group and per analysis for rats and mice, respectively). At 14 days, rat eyes (5 per group) were collected for assay of iron in ocular fluids.

Histology and thickness layer measurement

Fixed eyes were embedded in historesin (Leica, Nanterre, France) to facilitate the cutting of 5- μ m-thick sections through the detached area. Sections were stained with 1% toluidine blue solution. Sections were observed on a Leitz microscope. Sections with the most de-

tached retinal area were photographed (20 \times) with a Leica camera for measurements ($n = 5$ WT mice, $n = 5$ TG mice, $n = 5$ BSS-treated rats, and $n = 5$ TF-treated rats). Retinal thicknesses [from the OSs to the inner part of the ganglion cell layer (GCL) nuclei], the ONL, and the outer and inner segments were measured every 100 μ m (mice) and 300 μ m (rats) using ImageJ software by two different blind experimenters. Retinas were considered detached when an empty space was observed between the RPE and the OSs and attached when any signs of histological disturbance were observed. The retinal thickness ratio was calculated as the thickness in the detached retina/the thickness in the attached retina. For the ONL and segment thickness ratio, layer measurements were reported as the total retinal thickness of the corresponding retinal area using the formula (ONL detached/total retina detached)/(ONL attached/total retina attached).

Immunohistochemistry and fluorescence intensity evaluation

Fixed eyes were mounted in Tissue-Tek optimum cutting temperature (OCT) (Siemens Medical, Puteaux, France) to pass through the detached area. Explants were rinsed in 1 \times phosphate-buffered saline (PBS, Thermo Fisher Scientific, Cergy Pontoise, France), fixed for 20 min with 4% paraformaldehyde (Inland Europe, Conflans sur Lanterne, France), infiltrated in a sucrose gradient series, and then mounted in Tissue-Tek OCT. Immunohistochemistry was performed on 10- μ m-thick sections as previously described (12). Primary antibodies were rabbit polyclonal anti-TFR1 (Serotec, Oxford, UK), rabbit polyclonal specific for the light subunit of ferritin (P. Santambrogio), rabbit anti-gial fibrillary acid protein (Dako, Thermo Fisher Scientific), rabbit anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Wako Pure Chemical Industries, Neuss, Germany), mouse anti-CD68 (Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Colmar, France), anti-8-HGN (Abcam, Cambridge, UK), anti-4-HNE (Abcam), anti-rhodopsin (Rho4D2, Abcam), anti-cone arrestin (Millipore, Saint Quentin En Yvelines, France), and anti-IGFBP3 (Santa Cruz Biotechnology). Control sections were incubated with rabbit nonimmune serum (Thermo Fisher Scientific) or without primary antibodies. The corresponding Alexa-conjugated secondary antibodies (Thermo Fisher Scientific) were used to reveal the primary antibodies, and sections were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich). The TUNEL reaction was performed, along with DAPI staining, using the manufacturer's protocol (Roche Diagnostics, Meylan, France) as previously described (12). Propidium iodine (0.5 μ g/ml) was incubated directly with sections for 1 hour, and the nuclei were counterstained with DAPI.

The sections were photographed with a fluorescence microscope (BX51, Olympus, Rungis, France) using identical exposure parameters for all compared samples. Blind quantifications were realized on photographs acquired at 40 \times magnification with ImageJ software as follows: Quantification of cone nuclei (arrestin staining) or TUNEL-positive cells (20 \times magnifications) in mouse ($n = 5$ per group) or rat ($n = 5$ per group) models of RD was performed using three photographs of the attached retina and three photographs of the detached retina. Measurement of the OS length in rat retina ($n = 5$ per group) was realized in six photographs by delimiting Rho4D2 staining and calculating the mean OS length in each retina area. The OS length ratio was then calculated as described for histological measurement. For the explant model, all quantifications were performed on four photographs ($n = 3$ explants per group). The OS length measurement was realized by measuring at three equidistant points on the

photographs. Fluorescence intensity staining was evaluated on photographs and reported as the mean intensity under control conditions. Each sample measurement was averaged, and differences between the groups were analyzed.

Retinal explant cultures

Adult Wistar rat retinas were isolated from fresh enucleated eyes, divided into four parts, and transferred to 0.2-mm polycarbonate membranes (Millipore) with the GCL facing the membrane (Fig. 2). Mouse retinal explants were isolated as indicated above, with one explant corresponding to one eye. The insert was placed into a six-well culture plate containing Dulbecco's modified Eagle's medium with L-glutamine and 5% serum (Thermo Fisher Scientific) corresponding to day 0. To analyze the effects of iron exposure on retinal explants, 30 μ l of medium containing FeSO₄ (7H₂O; Sigma-Aldrich) was added to the PR side of the explants (upper chamber). To explore TF's therapeutic effects, the medium in the upper chamber was removed after 2 days. PBS was added for washing, and 30 μ l of medium containing human apoTF (0.5, 5, or 50 mg/ml; Sigma-Aldrich) was placed on the retinas. LDH release and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) directed against TF were measured in medium collected from the lower chamber as described previously (12, 13). Histology, iron staining, immunohistochemistry, and Western blotting were performed on explants as described below and in the time workflow legends.

Iron status

Vitreous and SRF samples from humans, ocular fluids from RD rats, and medium from rat explants ($n = 6$ per group) were diluted with 1% HNO₃ solution containing Rh (10 ng/ml) and indium (10 ng/ml) as internal standards. In addition, each analytical batch of study samples was processed with laboratory controls, including method blanks and standard reference materials to continuously monitor method performance. Samples were analyzed using an ICP-MS (7700 Series, Agilent, Santa Clara, CA, USA). Quantitative analysis of iron (Fe) was carried out by external calibration using seven standards, with concentrations ranging from 10 to 1000 ng/ml. The method was assessed using internal and external quality controls, analysis of initial calibration, a verification standard, procedural blanks, and duplicate samples.

TF and proteins were quantified using an ELISA kit (AssayPro, St Charles, USA) and a Micro BCA assay kit (Thermo Fisher Scientific), respectively. For human samples, heme iron contamination was verified with a hemoglobin colorimetric assay (AssayPro). Saturation of TF was calculated as the total iron content (μ M)/TIBC (μ M). TIBC measures the amount of iron that can potentially be stored in TF and corresponds to the capacity of 1 mol of TF (80,000 Da) to bind 2 mol of ferric iron and was calculated (μ M) as TF concentration (g/liter) $\times 10^6 \times (2/80,000)$.

Iron detection staining

Perl's reaction staining was performed by incubating in a solution containing 4% potassium ferrocyanide (Sigma-Aldrich) in 4% aqueous hydrochloric acid (Sigma-Aldrich) for 30 min at room temperature to yield a Prussian blue reaction product. Sensitivity for iron detection was enhanced by incubation with a solution of 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, 5 mg/ml; Sigma-Aldrich) containing 1% H₂O₂ for 30 min at room temperature. For nucleus counterstaining, incubation with a solution of 1% nuclear red or toluidine blue (Sigma-

Aldrich) was performed for 30 s. Stained sections were mounted in aqueous medium. Control of amplification was realized by incubation of sections with DAB without the preceding Perl's reaction step.

Imaging laser ablation (LA)-ICP-MS measurements were performed on a quadrupole instrument (Agilent 7700 ICP series, Darmstadt, Germany) hyphenated to a laser ablation system (NWR-213, New Wave, Fremont, USA) (33). Material on tissue sections was ablated by a Nd:YAG/213-nm laser focused at 18 μ m diameter before transport toward the ICP ion source by a helium carrier gas with a flow rate of 800 ml/min. The LA-ICP-MS parameters were optimized to provide the best signal-to-noise ratio while keeping the maximum reproducibility between analyses. In this way, the energy output was set at 23%, corresponding to a laser fluency of 0.35 J/cm². The lateral resolution was fixed at 20 μ m in the raster mode, with a scan speed and a repetition frequency of 20 Hz and 20 μ m/s, respectively. ⁵⁶Fe⁺ was monitored for a duty cycle of 1 s. Raw data were acquired using MassHunter software (Agilent, Darmstadt, Germany). Data files (.d) of the Imaging MS (IMS) experiments were successively converted into mzML and imzML formats using msconvert and imzMLConverter tools, respectively. Ion images were reconstructed and visualized using the MSIRReader v0.06 software.

Western blot analysis

Explants ($n = 4$ per group) were suspended in lysis MPER buffer (Thermo Fisher Scientific) and then centrifuged for 10 min at 4°C. Protein concentrations were calculated using the Micro BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific). Five to 10 μ g of total extract was mixed with protein loading buffer (Thermo Fisher Scientific) as per the manufacturer's instructions. Samples were loaded onto 4 to 12% bis-tris gel (Thermo Fisher Scientific), and proteins were transferred onto nitrocellulose membranes. Nonspecific binding was blocked with 5% nonfat dry milk in Tween/tris-buffered saline, and then membranes were incubated overnight at 4°C with the primary antibody against rhodopsin (1:5000; ab98887, Abcam), hTF (1:1000; ab88165, Abcam), IGFBP3 (clone E9, 1:1,000, Santa Cruz Biotechnology), caspase 3 (1:500; clone L-18, Santa Cruz Biotechnology), Bcl2 (1:500; clone N-19, Santa Cruz Biotechnology), RIP (1:500; clone 38, BD Transduction Laboratories), RIP3 (1:1000; PRS2283, Sigma-Aldrich), LC3B (1:1000; 2775, Cell Signaling Technology), or actin (1:4000; Sigma-Aldrich), followed by incubation with the supplier-recommended dilution of horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 hour (Vector Laboratories, Eurobio, Les Ulis, France). Protein bands were visualized by an enhanced chemiluminescence reaction (Thermo Fisher Scientific) using a Bioimaging system (MicroChemi 4.2, Berthold, France). The gray values of specific bands were analyzed using ImageJ, and the protein signals of interest were reported relative to the actin signal or to their respective cleaved forms (for caspase 3 and RIP) for each sample.

Real-time reverse transcription polymerase chain reaction

Neural retinas were isolated on ice and directly frozen until RNA isolation. Tissues were homogenized in tubes pre-filled with beads (Bertin Technologies, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) containing RLT lysis buffer (RNeasy mini kit, Qiagen, Courtaboeuf, France) for three cycles of 30 s at 5500 rpm in a Precellys Evolution homogenizer (Bertin Technologies, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). Total RNA was isolated with an RNeasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocols. RNA concentration, purity, and integrity were determined with an Agilent Bioanalyzer.

All RNA used had an RNA integrity number (RIN) superior to 8. First-strand complementary DNA (cDNA) was generated by reverse transcription using 88 ng of total RNA and a QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Quantitative polymerase chain reaction (PCR) using duplicate technical replicates was performed on a QuantStudio 5 PCR System (Thermo Fisher Scientific) using SYBR Green gene expression assay probes (QuantiTect Primer Assay, Qiagen) of the mouse target genes caspase 8 (*Casp8*, NM_009812; QT00171437), *Igfbp3* (NM_0008343; QT00493332), an endogenous control actin b (*Actb*, NM_007393; QT01136772), and QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). The expression levels of individual genes were normalized with *Actb* in the same sample by calculation of the ΔC_t value, and relative quantification was performed using the $\Delta\Delta C_t$ method with WT retina without DR serving as a control.

RNA sequencing

Retinas ($n = 4$ per group) were frozen immediately after isolation. Total RNA was extracted using a Precellys homogenizer (Ozyme, Bertin) and an RNeasy Mini kit (Qiagen). Samples were sent for sequencing to the iGenSeq transcriptomic platform of the Brain and Spine Institute (Paris, France). The RNA quality was evaluated by capillary electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer System), and RINs ranging from 7.8 to 8.2 were accepted for library generation. The cDNA library of each sample was prepared with a KAPA mRNA HyperPrep (Roche) for 75–base pair paired-end reads, according to the manufacturer's instructions. Each of the cDNA libraries was indexed for multiplexing (2×60 million reads per sample), and indexed libraries were sequenced on one lane of the Illumina NextSeq 500 device. Data were recorded in the FASTQ format.

RNA-seq data analysis

RNA-seq data analysis was performed by GenoSplice technology (www.genosplice.com). Sequencing, data quality, reads repartition (e.g., for potential ribosomal contamination), and insert size estimation were performed using FastQC, Picard Tools, SAMtools, and RSeQC. Reads were mapped using STAR v2.4.0 on the mm10 mouse genome assembly. A gene expression regulation study was performed as previously described (34). Briefly, for each gene present in the Mouse FAST DB v2016_1 annotations, reads aligning on constitutive regions (that are not prone to alternative splicing) were counted. On the basis of these read counts, normalization and differential gene expression were performed using DESeq2 on R (v.3.2.5). Only genes expressed in at least one of the two compared experimental conditions were further analyzed. Genes were considered as expressed if their reads per kilobase per million mapped reads (RPKM) value was greater than 93% of the background RPKM value on the basis of intergenic regions. Results were considered statistically significant for uncorrected P values ≤ 0.05 and fold changes ≥ 1.5 (GenBank accession number: GSE102824).

Pathway/GO analysis and transcription factor analysis

Clusterings and heat maps were performed on unlabeled data using “dist” and “hclust” functions in R, using Euclidean distance and the Ward agglomeration method. Analysis for enriched GO terms, KEGG pathways, and REACTOME pathways were performed using the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) Functional Annotation Tool (v6.8). GO terms and pathways were considered enriched if the fold enrichment is ≥ 2.0 , the uncorrected P value is ≤ 0.05 , and the minimum number of regulated

genes in the pathway/term is ≥ 2.0 . Analysis was performed three times using all regulated genes, using up-regulated genes, and using down-regulated genes only. The union of these three analyses was performed to provide a single list of results. Analysis for transcription factors was performed using orthologous genes between the mouse and the human with the DAVID Functional Annotation Tool (v6.8). Orthologous genes are aggregated in FAST DB from Ensembl Compara. The same thresholds and methods as GO terms and pathway analysis were used but with human data.

Statistical analysis

Results are presented as the mean \pm SEM. Analyses were performed using GraphPad Prism 5 software. Normal distribution of data was confirmed using the Shapiro-Wilk test. Comparisons between two groups of human ocular fluid samples were analyzed by an unpaired two-tailed Student's t test. Multiple comparisons were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post test as appropriate. Nonnormally distributed data were analyzed using a nonparametric Mann-Whitney test to compare the two groups. Unadjusted linear regression and two-tailed Pearson correlation analysis were performed to determine whether a relationship existed between iron concentration and delta LogMAR visual acuity or RD duration. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Study approval

The study involving human subjects adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki and was approved by the local ethics committee of the Swiss Department of Health on research involving human subjects (CER-VD N°340/15). For vitreous and SRFs, written informed consent was obtained from all patients after detailed explanation of the purpose and methods of the study. All experimental procedures performed using rats and mice were approved by the local ethics committee of the Charles Darwin European Council, University of Paris-Descartes. Experiments were performed in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology statement for the use of animals in ophthalmic and vision research.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material for this article is available at <http://advances.sciencemag.org/cgi/content/full/5/1/eaau9940/DC1>

Fig. S1. Cell death cellular markers in rat retinal explants exposed to iron.

Fig. S2. TF expression in mouse retinal explants protects from low-serum culturing conditions.

Fig. S3. TF expression in mouse retina explants reduced oxidative stress markers induced by iron.

Fig. S4. TF treatment preserves iron-exposed rat retinal explants from oxidative stress and inflammation.

Fig. S5. Animal models of RD.

Fig. S6. Iron accumulates in the rodent retina following RD.

Fig. S7. The expression of the TF protein partner, IGFBP3, in mice following RD.

Fig. S8. Proposed role of IGFBP3 in the protective effect of TF.

Table S1. Top 20 up- and down-regulated genes in TG compared with WT mice following RD.

Table S2. Pathways and genes regulated by TF and implicated in PR rescues.

Data file S1. Complete transcriptomic analysis.

References (35–44)

REFERENCES AND NOTES

1. Y. Murakami, S. Notomi, T. Hisatomi, T. Nakazawa, T. Ishibashi, J. W. Miller, D. G. Vavvas, Photoreceptor cell death and rescue in retinal detachment and degenerations. *Prog. Retin. Eye Res.* **37**, 114–140 (2013).
2. M. A. J. Van de Put, J. M. M. Hooymans, L. I. Los, Dutch Rhegmatogenous Retinal Detachment Study Group, The incidence of rhegmatogenous retinal detachment in The Netherlands. *Ophthalmology* **120**, 616–622 (2013).

3. B. A. Holden, T. R. Fricke, D. A. Wilson, M. Jong, K. S. Naidoo, P. Sankaridurg, T. Y. Wong, T. J. Naduvilath, S. Resnikoff, Global prevalence of myopia and high myopia and temporal trends from 2000 through 2050. *Ophthalmology* **123**, 1036–1042 (2016).
4. D. Mistry, M. A. Awan, S. Borooah, A. Syrogiannis, C. Lim-Fat, H. Campbell, A. F. Wright, B. W. Fleck, D. G. Charteris, D. Yorston, J. Singh, Long-term visual acuity and the duration of macular detachment: Findings from a prospective population-based study. *Br. J. Ophthalmol.* **97**, 149–152 (2013).
5. M. A. J. van de Put, L. Hoeksema, W. Wanders, I. M. Nolte, J. M. M. Hooymans, L. I. Los, Postoperative vision-related quality of life in macula-off rhegmatogenous retinal detachment patients and its relation to visual function. *PLOS ONE* **9**, e114489 (2014).
6. D. H. Anderson, W. H. Stern, S. K. Fisher, P. A. Erickson, G. A. Borgula, Retinal detachment in the cat: The pigment epithelial-photoreceptor interface. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **24**, 906–926 (1983).
7. G. Trichonas, Y. Murakami, A. Thanos, Y. Morizane, M. Kayama, C. M. Debouck, T. Hisatomi, J. W. Miller, D. G. Vavvas, Receptor interacting protein kinases mediate retinal detachment-induced photoreceptor necrosis and compensate for inhibition of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 21695–21700 (2010).
8. G. P. Lewis, C. J. Guérin, D. H. Anderson, B. Matsumoto, S. K. Fisher, Rapid changes in the expression of glial cell proteins caused by experimental retinal detachment. *Am. J. Ophthalmol.* **118**, 368–376 (1994).
9. R. Eid, N. T. T. Arab, M. T. Greenwood, Iron mediated toxicity and programmed cell death: A review and a re-examination of existing paradigms. *Biochim. Biophys. Acta* **1864**, 399–430 (2017).
10. X. He, P. Hahn, J. Iacovelli, R. Wong, C. King, R. Bhisitkul, M. Massaro-Giordano, J. L. Dunaief, Iron homeostasis and toxicity in retinal degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* **26**, 649–673 (2007).
11. E. Picard, I. Fontaine, L. Jonet, F. Guillou, F. Behar-Cohen, Y. Courtois, J.-C. Jeanny, The protective role of transferrin in Müller glial cells after iron-induced toxicity. *Mol. Vis.* **14**, 928–941 (2008).
12. E. Picard, Q. Le Rouzic, A. Oudar, M. Berdugo, M. El Sanharawi, C. Andrieu-Soler, M. C. Naud, L. Jonet, C. Latour, C. Klein, S. Galiacy, F. Maleceze, H. Coppin, M. P. Roth, J. C. Jeanny, Y. Courtois, F. Behar-Cohen, Targeting iron-mediated retinal degeneration by local delivery of transferrin. *Free Radic. Biol. Med.* **89**, 1105–1121 (2015).
13. E. Picard, L. Jonet, C. Sergeant, M.-H. Vesvres, F. Behar-Cohen, Y. Courtois, J.-C. Jeanny, Overexpressed or intraperitoneally injected human transferrin prevents photoreceptor degeneration in rd10 mice. *Mol. Vis.* **16**, 2612–2625 (2010).
14. J. Winkler, H. Hoerauf, The retinal organ culture—a model system for the examination of the early cytoskeletal reaction pattern after retinal detachment. *Klin. Monbl. Augenheilkd.* **225**, 269–275 (2008).
15. H. Matsumoto, J. W. Miller, D. G. Vavvas, Retinal detachment model in rodents by subretinal injection of sodium hyaluronate. *J. Vis. Exp.* **2013**, e50660 (2013).
16. G. P. Lewis, S. K. Fisher, Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: Its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int. Rev. Cytol.* **230**, 263–290 (2003).
17. G. Miljuš, V. Malenković, B. Đukanović, N. Kolundžić, O. Nedić, IGF1BP-3/transferrin/transferrin receptor 1 complexes as principal mediators of IGF1BP-3 delivery to colon cells in non-cancer and cancer tissues. *Exp. Mol. Pathol.* **98**, 431–438 (2015).
18. M. Cederlund, F. Ghosh, K. Arnér, S. Andréasson, B. Åkerström, Vitreous levels of oxidative stress biomarkers and the radical-scavenger α_1 -microglobulin/A1M in human rhegmatogenous retinal detachment. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **251**, 725–732 (2013).
19. B. Baumann, J. Sterling, Y. Song, D. Song, M. Fruttiger, M. Gillies, W. Shen, J. L. Dunaief, Conditional Müller cell ablation leads to retinal iron accumulation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **58**, 4223–4234 (2017).
20. J. C. Jeanny, E. Picard, C. Sergeant, L. Jonet, M. Yefimova, Y. Courtois, Iron and regulatory proteins in the normal and pathological retina. *Bull. Acad. Natl. Med.* **197**, 661–674 (2013).
21. M. H. Guajardo, A. M. Terrasa, A. Catalá, Lipid–protein modifications during ascorbate- Fe^{2+} peroxidation of photoreceptor membranes: Protective effect of melatonin. *J. Pineal Res.* **41**, 201–210 (2006).
22. D. Devos, C. Moreau, J. C. Devedjian, J. Kluz, M. Petrault, C. Laloux, A. Jonneaux, G. Ryckwaert, G. Garçon, N. Rouaix, A. Duhamel, P. Jissendi, K. Dujardin, F. Auger, L. Ravasi, L. Hopes, G. Grolez, W. Firdaus, B. Sablonnière, I. Strubi-Vuillaume, N. Zahr, A. Destée, J. C. Corvol, D. Pörtl, M. Leist, C. Rose, L. Defebvre, P. Marchetti, Z. I. Cabantchik, R. Bordet, Targeting chelatable iron as a therapeutic modality in Parkinson's disease. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 195–210 (2014).
23. N. Parakh, R. Sharma, O. Prakash, D. Mahto, B. Dhingra, S. Sharma, J. Chandra, Neurological complications and cataract in a child with thalassemia major treated with deferoxamine. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **37**, e433–e434 (2015).
24. M. Di Nicola, G. Barteselli, L. Dell'Arti, R. Ratiglia, F. Viola, Functional and structural abnormalities in deferoxamine retinopathy: A review of the literature. *Biomed. Res. Int.* **2015**, 249617 (2015).
25. N. Mobarra, M. Shanaki, H. Ehteram, H. Nasiri, M. Sahmani, M. Saeidi, M. Goudarzi, H. Pourkarim, M. Azad, A review on iron chelators in treatment of iron overload syndromes. *Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell Res.* **10**, 239–247 (2016).
26. V. A. Lesnikov, M. P. Lesnikova, H. J. Deeg, Neuroimmunomodulation and aging: A role for transferrin and the hypothalamus/thymus axis. *Curr. Aging Sci.* **6**, 21–28 (2013).
27. H. Sakamoto, N. Sakamoto, M. Oryu, T. Kobayashi, Y. Ogawa, M. Ueno, M. Shinnou, A novel function of transferrin as a constituent of macromolecular activators of phagocytosis from platelets and their precursors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**, 270–274 (1997).
28. A. Longatti, C. A. Lamb, M. Razi, S.-i. Yoshimura, F. A. Barr, S. A. Tooze, TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes. *J. Cell Biol.* **197**, 659–675 (2012).
29. M. A. Johnson, S. M. Firth, IGF1BP-3: A cell fate pivot in cancer and disease. *Growth Horm. IGF Res.* **24**, 164–173 (2014).
30. S. Storch, B. Kübler, S. Höning, M. Ackmann, J. Zapf, W. Blum, T. Braulke, Transferrin binds insulin-like growth factors and affects binding properties of insulin-like growth factor binding protein-3. *FEBS Lett.* **509**, 395–398 (2001).
31. R. C. Baxter, Nuclear actions of insulin-like growth factor binding protein-3. *Gene* **569**, 7–13 (2015).
32. K.-W. Lee, B. Liu, L. Ma, H. Li, P. Bang, H. P. Koeffler, P. Cohen, Cellular internalization of insulin-like growth factor binding protein-3: Distinct endocytic pathways facilitate re-uptake and nuclear localization. *J. Biol. Chem.* **279**, 469–476 (2003).
33. E. Lauer, M. Villa, M. Jotterand, R. Vilarino, M. Bollmann, K. Michaud, S. Grabherr, M. Augsburger, A. Thomas, Imaging mass spectrometry of elements in forensic cases by LA-ICP-MS. *Int. J. Leg. Med.* **131**, 497–500 (2017).
34. L. Noli, A. Capalbo, C. Ogilvie, Y. Khalaf, D. Ilic, Discordant growth of monozygotic twins starts at the blastocyst stage: A case study. *Stem Cell Rep.* **5**, 946–953 (2015).
35. D. Cosgrove, M. Zallocchi, Usher protein functions in hair cells and photoreceptors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **46**, 80–89 (2014).
36. P. A. Williams, C. E. Braine, N. E. Foxworth, K. E. Cochran, S. W. M. John, GlyCAM1 negatively regulates monocyte entry into the optic nerve head and contributes to radiation-based protection in glaucoma. *J. Neuroinflammation* **14**, 93 (2017).
37. M. Gold, A. M. Dolga, J. Koepke, D. Mengel, C. Culmsee, R. Dodel, A. R. Kocuzulla, J.-P. Bach, α_1 -Antitrypsin modulates microglial-mediated neuroinflammation and protects microglial cells from amyloid- β -induced toxicity. *J. Neuroinflammation* **11**, 165 (2014).
38. M. Lee, S. Li, K. Sato, M. Jin, Interphotoreceptor retinoid-binding protein mitigates cellular oxidative stress and mitochondrial dysfunction induced by all-trans-retinal. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **57**, 1553–1562 (2016).
39. V. Higenell, E. S. Ruthazer, Layers upon layers: MHC class I acts in the retina to influence thalamic segregation. *Neuron* **65**, 439–441 (2010).
40. H. Matsumoto, K. Kataoka, P. Tsoka, K. M. Connor, J. W. Miller, D. G. Vavvas, Strain difference in photoreceptor cell death after retinal detachment in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**, 4165–4174 (2014).
41. C. R. Elliott-Hunt, F. E. Holmes, D. M. Hartley, S. Perez, E. J. Mufson, D. Wynick, Endogenous galanin protects mouse hippocampal neurons against amyloid toxicity in vitro via activation of galanin receptor-2. *J. Alzheimers Dis.* **25**, 455–462 (2011).
42. Y. Inoue, M. Shimazawa, S. Nakamura, T. Imamura, S. Sugitani, K. Tsuruma, H. Hara, Protective effects of placental growth factor on retinal neuronal cell damage. *J. Neurosci. Res.* **92**, 329–337 (2014).
43. A. S. Coyner, R. C. Ryals, C. A. Ku, C. M. Fischer, R. C. Patel, S. Datta, P. Yang, Y. Wen, R. Hen, M. E. Pennesi, Retinal neuroprotective effects of flibanserin, an FDA-approved dual serotonin receptor agonist-antagonist. *PLOS ONE* **11**, e0159776 (2016).
44. A. Maeda, T. Maeda, M. Golczak, Y. Imanishi, P. Leahy, R. Kubota, K. Palczewski, Effects of potent inhibitors of the retinoid cycle on visual function and photoreceptor protection from light damage in mice. *Mol. Pharmacol.* **70**, 1220–1229 (2006).

Acknowledgments: We thank Y. Courtois, A. Torriglia, I. Jaadane, and M. Abitbol (Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, UMRS 1138) for guidance, stimulating discussion, and manuscript reviews. We thank the Institut du cerveau et de la Moelle épinière (ICM) (Plateforme de Séquençage-iGenSeq; Hôpital de la Salpêtrière) for RNA-seq and GenoSplice for data analysis. We wish to thank P. Santambrogio (Department of Biological and Technological Research, Instituto de Ricovero e Cure a Carattere Scientifico, San Raffaele, Milan, Italy) for the rabbit polyclonal antibody specific for the high and light subunits of ferritin. We also wish to thank MGraphique and S. Maroillez for illustrations. We would like to thank Editage (www.editage.com) for English language editing. **Funding:** This study was supported by INSERM, ANR JCJC 2015 Transfiron, The Abraham J. & Phyllis Katz Foundation, Veterans Administration RR&D Center Grant C9246C, Merit Award I01RX002806, SPiRE Award I21RX001924, NIH (R01EY028859 and P30EY006360), and an unrestricted grant from Research

to Prevent Blindness Inc. **Author contributions:** A.D. conducted experiments and surgeries, acquired and analyzed data, and wrote the manuscript. Q.L.R. conducted immunohistochemistry studies and PCR experiments and acquired data. L.J. conducted histological experiments. M.-C.N. conducted histological and animal experiments. L.K. acted as human samples biobank manager. J.-A.P. conducted surgeries and acquired data. J.H.B. conducted experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. A.T. conducted iron assay experiments. N.T. conducted transferrin assay experiments. A.M. conducted human iron staining experiments. F.B.-C. designed research studies, conducted experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. E.P. designed research studies, conducted experiments, acquired and analyzed data, and wrote the manuscript. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Materials.

Additional data related to this paper may be requested from the authors. GenBank accession number: GSE102824.

Submitted 3 August 2018
Accepted 28 November 2018
Published 9 January 2019
10.1126/sciadv.aau9940

Citation: A. Daruich, Q. Le Rouzic, L. Jonet, M.-C. Naud, L. Kowalczyk, J.-A. Pourmaras, J. H. Boatright, A. Thomas, N. Turck, A. Moulin, F. Behar-Cohen, E. Picard, Iron is neurotoxic in retinal detachment and transferrin confers neuroprotection. *Sci. Adv.* **5**, eaau9940 (2019).

Supplementary Materials for

Iron is neurotoxic in retinal detachment and transferrin confers neuroprotection

Alejandra Daruich, Quentin Le Rouzic, Laurent Jonet, Marie-Christine Naud, Laura Kowalczyk, Jean-Antoine Pournaras, Jeffrey H. Boatright, Aurélien Thomas, Natacha Turck, Alexandre Moulin, Francine Behar-Cohen,* Emilie Picard

*Corresponding author. Email: francine.behar@gmail.com

Published 9 January 2019, *Sci. Adv.* **5**, eaau9940 (2019)
DOI: 10.1126/sciadv.aau9940

The PDF file includes:

- Fig. S1. Cell death cellular markers in rat retinal explants exposed to iron.
- Fig. S2. TF expression in mouse retinal explants protects from low-serum culturing conditions.
- Fig. S3. TF expression in mouse retina explants reduced oxidative stress markers induced by iron.
- Fig. S4. TF treatment preserves iron-exposed rat retinal explants from oxidative stress and inflammation.
- Fig. S5. Animal models of RD.
- Fig. S6. Iron accumulates in the rodent retina following RD.
- Fig. S7. The expression of the TF protein partner, IGFBP3, in mice following RD.
- Fig. S8. Proposed role of IGFBP3 in the protective effect of TF.
- Table S1. Top 20 up- and down-regulated genes in TG compared with WT mice following RD.
- Table S2. Pathways and genes regulated by TF and implicated in PR rescues.
- Legend for data file S1
- References (35–44)

Other Supplementary Material for this manuscript includes the following:

(available at advances.sciencemag.org/cgi/content/full/5/1/eaau9940/DC1)

Data file S1 (Microsoft Excel format). Complete transcriptomic analysis.

Supplementary Materials

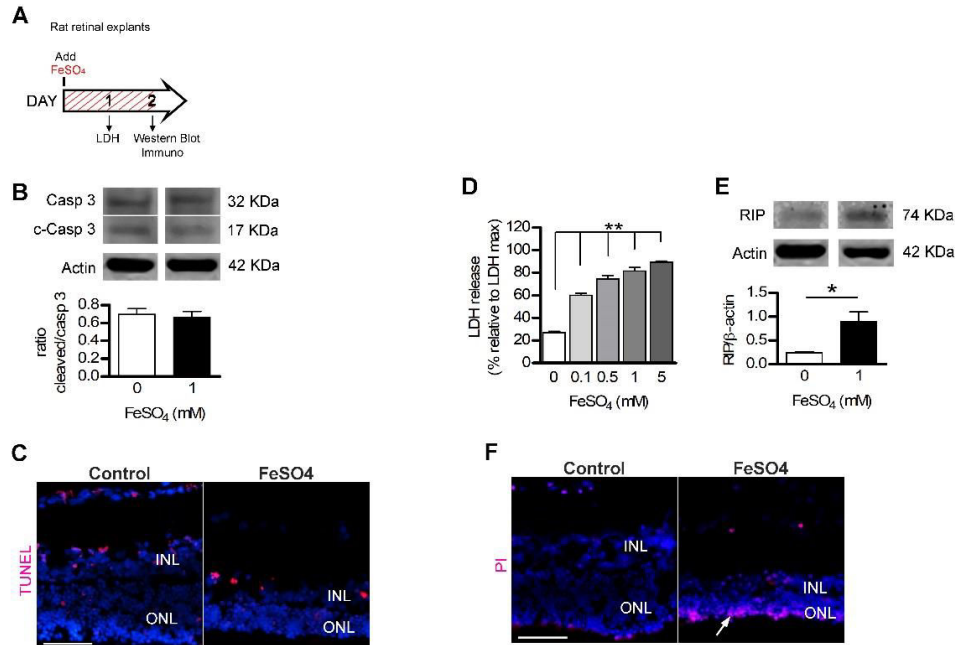


Fig. S1. Cell death cellular markers in rat retinal explants exposed to iron. (A) Timed workflow of rat retinal explants exposed to 1 mM FeSO₄ for 2 days. (B) Western blot and quantitative analysis of cleaved caspase 3 protein reported relative to pro-caspase 3 protein expression (n=3). (C) The absence of the apoptotic nucleus, marked with TUNEL, in control and iron-exposed explants. (D) After one day of exposure, an early necrotic marker, lactate dehydrogenase (LDH) released in the medium, was increased according to the iron (FeSO₄) concentration. Mann Whitney test (n=6), **p=0.002 compared to explants without iron exposure. (E) Western blot and quantitative analysis of RIP3 protein reported relative to actin protein expression. Mann Whitney test (n=3), *p=0.028. (F) Necrotic nuclei stained with propidium iodide (PI) were only observed in iron-exposed retinal explants. ONL: Outer nuclear layer; INL: Inner nuclear layer. Scale bars: 50 μ m. All values are represented as the mean \pm SEM.

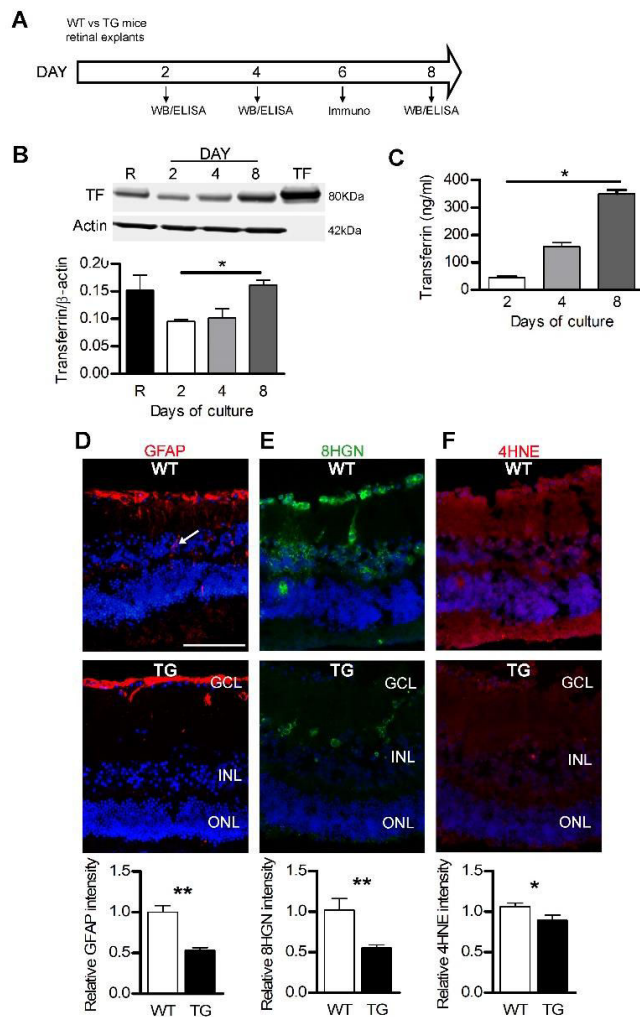


Fig. S2. TF expression in mouse retinal explants protects from low-serum culturing conditions.

(A) Illustration of the timed workflow for retinal explants from wild-type (WT) and transgenic mice (TG) expressing human transferrin (TF): mouse retinas were dissected and placed in culture.

Quantification of TF levels was performed by western blotting and ELISA at day 2, 4 and 8. Effects of culture conditions on retinal explants were evaluated by immunostaining at day 6. (B) Western blotting and quantitative analysis of TF in retinas of TG mice following 2, 4 or 8 days of culture. Mann Whitney test (n=3, *p=0.04). (C) Release of TF in culture medium of TG retinal explants increased with days of culture. Mann Whitney test (n=6, *p=0.04). (D-F) TF decreased immunostaining of markers characterizing Müller glial cell activation (D, Glial fibrillary acidic protein, arrows), DNA damage (E, 8-Hydroxyguanosine), lipid peroxidation (F, 4-Hydroxynonenal).

Measurements of staining intensity were reported relative to WT explants. Mann Whitney test (n=3),

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. GCL: Ganglion cell layer; ONL: Outer nuclear layer; INL: Inner nuclear layer; S: Segments. Scale bar: 100 μ m. All values are represented as the mean \pm SEM. R= Retina.

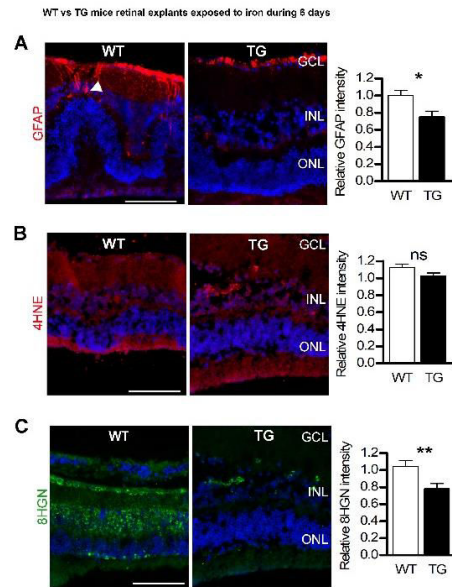


Fig. S3. TF expression in mouse retina explants reduced oxidative stress markers induced by iron. Retinal explants from wild-type (WT) and transgenic mice (TG) expressing human transferrin (TF) were exposed to 1 mM of FeSO_4 during 6 days. Quantification of immunostaining intensity for markers of Müller glial cell activation (**A**, Glial fibrillary acidic protein, arrows), lipid peroxidation (**B**, 4-hydroxynonenal), and DNA damage (**C**, 8-hydroxyguanosine) were decreased in TG explants compared with WT explants. Mann Whitney test ($n=3$), $*p<0.05$; $**p<0.01$; ns: not significant. GCL: Ganglion cell layer; ONL: Outer nuclear layer; INL: Inner nuclear layer. Scale bars: 100 μm All values are represented as the mean \pm SEM.

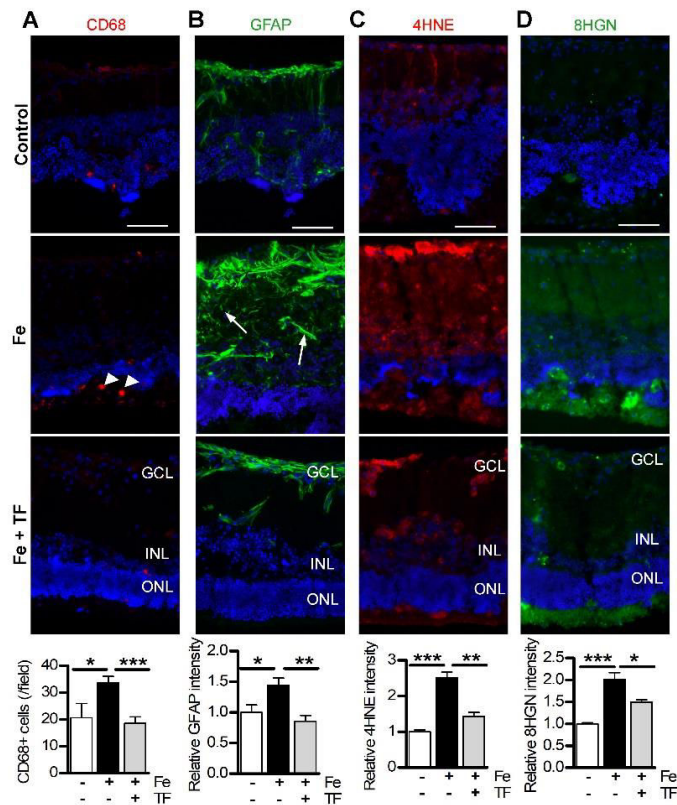
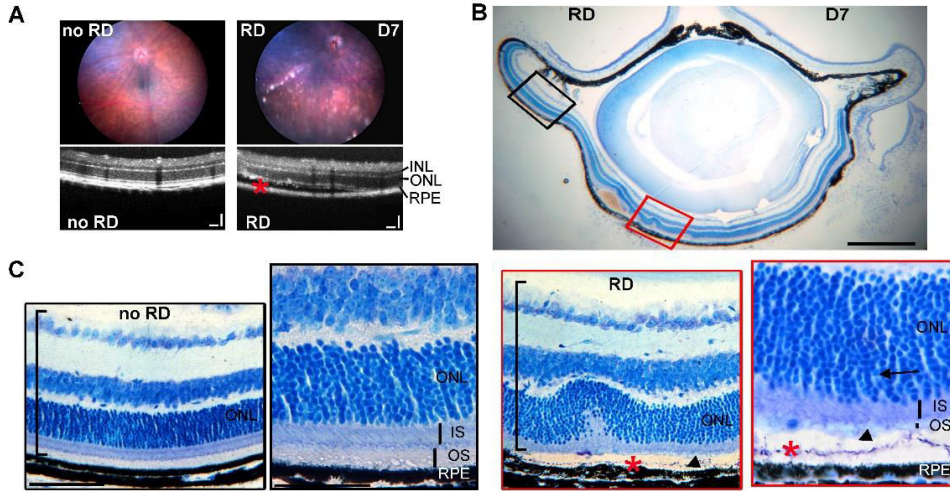


Fig. S4. TF treatment preserves iron-exposed rat retinal explants from oxidative stress and inflammation. Adult rat retinas were exposed for 2 days with 1 mM FeSO₄. Afterwards, the medium was completely replaced and explants were treated with 50 mg/ml of human TF for 4 days. Control explants were cultured with medium alone. Immunostaining of activated macrophages/microglia (**A**, CD68, arrowheads), Müller glial cells activation (**B**, Glial fibrillary acidic protein), lipid peroxidation (**C**, 4-Hydroxynonenal), and DNA damage (**D**, 8-Hydroxyguanosine) were significantly lower in explants treated with TF (Fe+TF) than without treatment (Fe). Fluorescence intensity was reported relative to control conditions. One-way ANOVA, Bonferroni post-test (n=3), *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. GCL: Ganglion cell layer; ONL: Outer nuclear layer; INL: Inner nuclear layer. Scale bars: 100 μ m. All values are represented as mean \pm SEM.

MICE



RAT

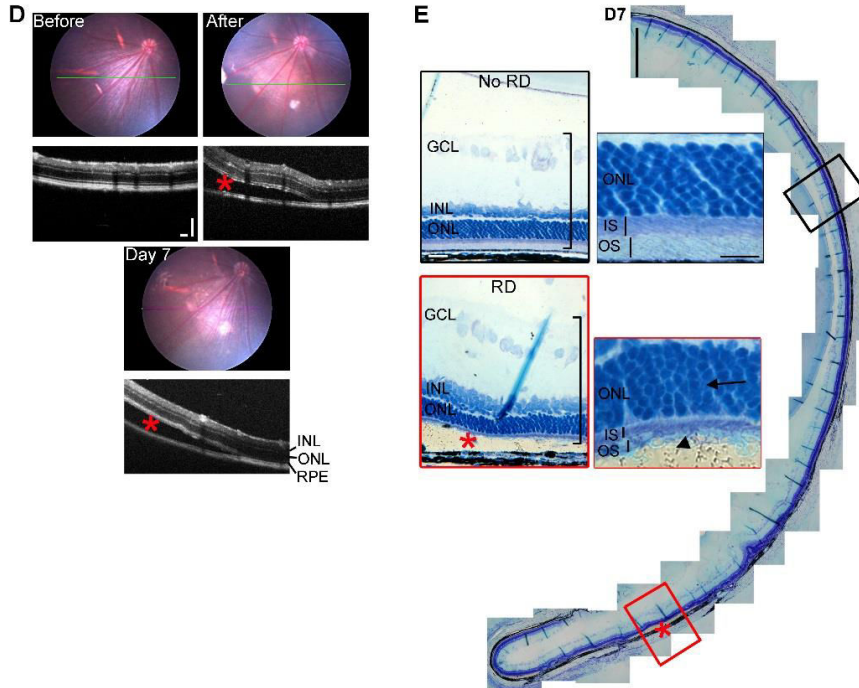


Fig. S5. Animal models of RD. (A-C) The mouse model of retinal detachment (RD). (A) Representative fundus photographs and the corresponding optical coherence tomography (OCT) images from a control eye (no RD, left) and an eye with RD 7 days after induction (red asterisk shows subretinal space, right). (B) Retinal semi-thin sections 7 days after RD showing the detached area. The red box denotes the detached area and the black box denotes the undetached retina. (C) Higher magnification showing increased retinal thickness (brackets), reduced outer segment length (arrowhead) and ONL disorganization with pyknotic PR nuclei (arrows). Note the subretinal space (red asterisk). (D-E) Rat model of retinal detachment. (D) Representative fundus photographs and the corresponding OCT images before RD, immediately after RD induction (red asterisk) and 7 days later. RD persists 7 days after induction (red asterisk). (E) Retinal semi-thin sections 7 days after RD showing the detached (red box and asterisk) and the undetached areas (black box). Note the increased retinal thickness (brackets) in the detached retina compared to the undetached retina. Furthermore, higher magnification of the detached area showed a loss of the outer segments (arrowhead) and pyknotic photoreceptor nuclei (arrow), as compared with the undetached retina. INL: Inner nuclear layer; IS: Inner segment; ONL: Outer nuclear layer; OS: Outer segment; RPE: retinal pigmented epithelium. Nuclei were stained with toluidine blue. Scale bars: 200 μm (A-E), 500 μm (C; E), 50 μm (B), 25 μm (E, high magnification).

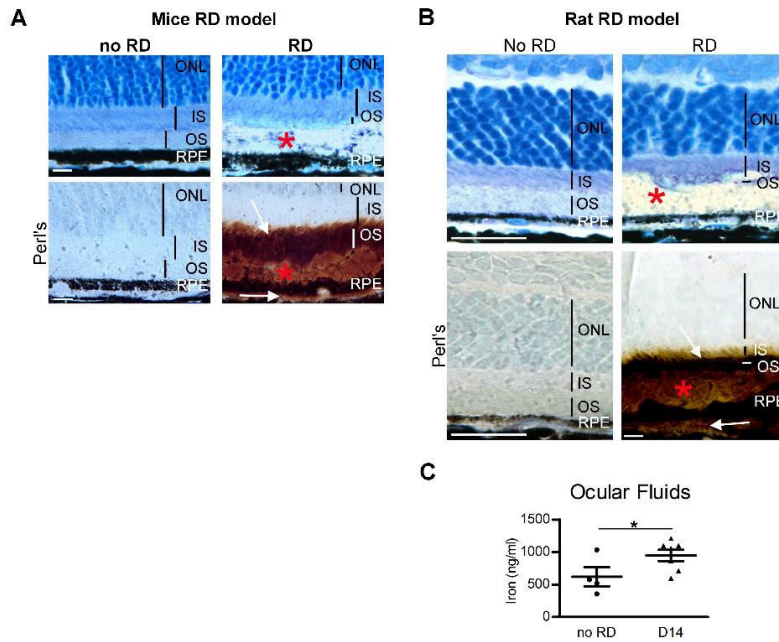


Fig. S6. Iron accumulates in the rodent retina following RD. (A-B) 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) amplified Perl's reaction revealed iron accumulation (arrows) in the outer and inner segments and under the RPE layer in mice (A) and rats (B) 7 days after induction of retinal detachment (RD) (red asterisk). (C) Iron levels were increased in the ocular fluids of rats 14 days after RD. Mann Whitney test ($n=4-6$), $p=0.042$. INL: Inner nuclear layer; IS: Inner segment; ONL: Outer nuclear layer; OS: Outer segment; RPE: retinal pigmented epithelium. Nuclei were stained with toluidine blue. Scale bars: 50 μm (A), 25 μm (B). All values are represented as the mean \pm SEM.

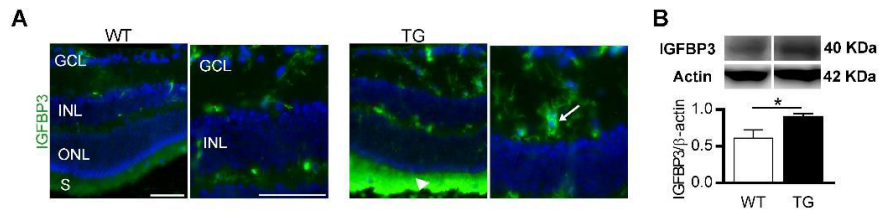


Fig. S7. The expression of the TF protein partner, IGFBP3, in mice following RD. (A) Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP3) staining was increased in photoreceptor segments (S, arrowhead) and in cells present in the inner plexiform layer (arrow) in retinas from TG mice compared with WT mice, 7 days after retinal detachment induction. (B) Western blotting and quantitative analysis of IGFBP3 in the retinas of TG and WT mice 4 days after RD. Mann Whitney test (n=3-5, *p=0.028). GCL: Ganglion cell layer; INL: Inner nuclear layer; IS: Inner segment; ONL: Outer nuclear layer; OS: Outer segment; RPE: Retinal pigmented epithelium. Scale bar: 50 μ m. All values are represented as the mean \pm SEM.

Fig. S8. Proposed role of IGFBP3 in the protective effect of TF. The formation of the IGFBP3–TF complexes may be expected: **i)** to reduce IGFBP3 binding on its cell-surface specific receptors, IGFBP-3R and low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1), and inhibits caspase-dependent apoptosis and growth inhibition through the dephosphorization of the insulin receptor substrate (IRS) by a Ser/Thr-specific protein phosphatase. **ii)** to enhance the interaction of IGFBP3 with multiple extracellular components including glycosaminoglycan (GAG) or receptors for its cellular uptake. IGFBP3 binding to the extracellular matrix promotes sphingosine-1-phosphate (S1P) production by inhibiting sphingomyelinase (SMase) and increasing sphingosine-1-phosphatase (SphK1). S1P interaction with S1PR receptors leads to multi pathways like preservation of blood barrier integrity, and also transactivation of EGFR leading to a caveolin-mediated endocytosis of the complex EGFR-IGFBP3. The IGFBP3-TF complex is taken up by the TF receptor **1** and internalized by a clathrin endocytosis vesicle. IGFBP3 and its binding partners (TF or EGFR) may be then found in the late endosome/multivesicular body for redistribution of molecules in the cell. **iii)** Nuclear import of IGFBP3 is mediated by importin beta, where it can form nuclear complexes. Phosphorylation of nuclear IGFBP3 by DNA-PKcs, resulting in activation of IGFBP3-EGFR-DNA-PK complexes and favoring double-strand DNA break repair by non-homologous end-joining (NHEJ). The IGFBP3-RXR alpha interaction increased RXRalpha homodimer transcriptional activity whereas it prevented formation of the RXRalpha-RARalpha, and RXRalpha-PPRAgamma **or** RXRalpha-Nur77 heterodimers. The endoplasmic reticulum (ER) is one of the probable sources of the autophagosomal double membrane in mammals, and the ER-resident chaperone GPR78 is required for stress-induced autophagy. The interaction IGFBP3 with GPR78 (**iv**) stimulates the autophagic survival response in case of nutrient deprivation or hypoxia.

(for literature review (29, 31, 32))

Table S1. Top 20 up- and down-regulated genes in TG compared with WT mice following RD.

Gene Symbol	Gene Name	Fold-Change	P-Value	Entrez Gene ID
Genes up-regulated				
<i>Gm19554</i>	predicted gene, 19554	88,67	1,04E-19	100503099
<i>Serpina3h</i>	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3H	22,11	6,88E-05	546546
<i>Snord15a</i>	small nucleolar RNA, C/D box 15A	14,88	3,51E-02	449630
<i>Gab3</i>	growth factor receptor bound protein 2-associated protein 3	4,83	1,14E-02	100503280
<i>Lilrb4a</i>	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 4A	4,48	1,38E-03	14728
<i>Hmox1</i>	heme oxygenase 1	4,28	1,84E-03	15368
<i>Mmp12</i>	matrix metalloproteinase 12	4,27	1,45E-02	17381
<i>Glycam1</i>	glycosylation dependent cell adhesion molecule 1	4,19	3,36E-04	14663
<i>Cym</i>	chymosin	3,87	8,42E-03	229697
<i>Ms4a6d</i>	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6D	3,60	1,49E-02	68774
<i>Igfbp3</i>	insulin-like growth factor binding protein 3	3,27	5,28E-05	16009
<i>Fndc1</i>	fibronectin type III domain containing 1	3,20	4,84E-11	68655
<i>Msr1</i>	macrophage scavenger receptor 1	3,00	1,30E-02	20288
<i>Cd36</i>	CD36 antigen	2,85	6,88E-07	12491
<i>Gal</i>	galanin	2,84	1,75E-02	14419
<i>Tmem221</i>	transmembrane protein 221	2,78	1,74E-03	434325
<i>Ccl17</i>	chemokine (C-C motif) ligand 17	2,78	1,06E-02	20295
<i>Sphk1</i>	sphingosine kinase 1	2,75	4,88E-03	20698
<i>Il2rg</i>	interleukin 2 receptor, gamma chain	2,74	4,94E-03	16186
<i>H2-Q7</i>	histocompatibility 2, Q region locus 7	2,74	6,11E-06	15018
Genes down-regulated				
<i>S100a9</i>	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	8,34	3,94E-03	20202
<i>G530011O06Rik</i>	RIKEN cDNA G530011O06 gene	6,38	1,03E-02	--
<i>Sik1</i>	salt inducible kinase 1	3,73	9,62E-03	17691
<i>Crnde</i>	colorectal neoplasia differentially expressed (non-protein coding)	3,56	2,33E-05	71296

<i>Thoc2</i>	THO complex 2	3,16	2,79E-04	<u>331401</u>
<i>Klf4</i>	Kruppel-like factor 4 (gut)	3,10	2,39E-03	<u>16600</u>
<i>Zfp26</i>	zinc finger protein 26	2,89	1,80E-03	<u>22688</u>
<i>Klf2</i>	Kruppel-like factor 2 (lung)	2,86	1,65E-03	<u>16598</u>
<i>Tubb2a-ps2</i>	tubulin, beta 2a, pseudogene 2	2,75	3,60E-02	<u>627110</u>
<i>Sec24a</i>	Sec24 related gene family, member A	2,69	5,45E-04	<u>77371</u>
<i>Nipbl</i>	Nipped-B homolog (Drosophila)	2,66	1,19E-02	<u>71175</u>
<i>Tfrc</i>	transferrin receptor	2,50	8,27E-03	<u>22042</u>
<i>Hook1</i>	hook microtubule tethering protein 1	2,48	2,65E-02	<u>77963</u>
<i>Ctif</i>	CBP80/20-dependent translation initiation factor	2,47	1,16E-02	<u>269037</u>
<i>Ncoa2</i>	nuclear receptor coactivator 2	2,46	4,82E-02	<u>17978</u>
<i>Tet3</i>	tet methylcytosine dioxygenase 3	2,44	4,36E-03	<u>194388</u>
<i>Setd7</i>	SET domain containing (lysine methyltransferase) 7	2,32	3,72E-02	<u>73251</u>
<i>Cdon</i>	cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes	2,31	6,65E-03	<u>57810</u>
<i>Srgap3</i>	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3	2,30	2,38E-02	<u>259302</u>
<i>Rptor</i>	regulatory associated protein of MTOR, complex 1	2,29	1,95E-02	<u>74370</u>

Table S2. Pathways and genes regulated by TF and implicated in PR rescues.

Pathways	Genes regulated by TF	Functions	References
Retina homeostasis	<i>Cdhr1, Pcdh15, Mak, Rpl, Ush1g</i>	found in PR cilium for protein trafficking through the connecting cilium	(35)
	<i>Tbc1d14, Evi5, Tbc1d30, Usp6nl</i>	negative regulator of Rab proteins family, implicated in rhodopsin transport in cilium photoreceptors	(28)
Immune systems	<i>Serpina3h, Glycam1(7), S100a9, Klf4, B2m, Tyrobp, Trem2</i>	neuroprotective modulation of inflammation	(36, 37)
Phagocytosis	<i>Cd36, Cd14, Siglech</i>	facilitate endocytosis/phagocytosis	(27)
	<i>Igfbp3, Sphk, S1PR, PPARg, Nur77, Rxra,</i>	intracellular neuroprotective effects of IGFBP3	(31) fig. S8
Neurological process	<i>Adam17, Lrig2</i>	regulation of the repulsive guidance molecules	(38)
	<i>B2m H2-Q7, H2-T23, H2-K1</i>	major histocompatibility complex Class I play roles in structural and synaptic remodeling in the developing and mature retina	(39)
Mechanism of cell death	<i>Birc5 (Survivin)</i>	inhibit caspase activation	(40)
Metabolism	<i>Pgf, Gal, Calca</i>	protection for neurons	(41, 42)
	<i>Sik1, Htr2c, Hcrtr1</i>	inhibit hyperpolarization of neurons and allow protection	(43)
	<i>Dusp1, Rxra, Tek, Klf4, Igfr2</i>	inhibit cycle of retinoid that protect PR from light damage	(44)

Data file S1. Complete transcriptomic analysis. The file is composed with a list of the regulated genes, the GO analysis and the analysis of splicing factors and others genes encoding for RNA-binding proteins (transcription Factors)

3.2 Article 3: Oral Ursodeoxycholic acid can protect photoreceptors in retinal detachment

(En soumission)

Cette étude se compose d'une partie clinique et d'une partie expérimentale.

Nous avons d'abord mené une étude prospective interventionnelle sur 26 patients présentant un DR rhégmato-gène, afin d'évaluer le passage d'UDCA à travers barrière hémato-rétinienne et les concentrations atteintes dans les liquides oculaires. 21 patients ont reçu une dose d'UDCA de 10mg/kg administrée oralement à différents intervalles de temps avant vitrectomie. 5 patients n'ont pas été traités, constituant le groupe témoin. Un prélèvement sanguin a été effectué avant l'administration du traitement, et à 7 jours. Pendant l'intervention, des prélèvements de vitré et de LSR ont été effectués. Le traitement a été maintenu pendant 4 mois et les effets secondaires ont été recueillis. La concentration d'UDCA dans les liquides oculaires et le plasma des patients a été déterminée par spectrométrie de masse. Les concentrations d'UDCA dans le plasma n'étaient pas différentes entre les groupes à baseline, mais étaient considérablement augmentées chez les patients traités à 7 jours. UDCA était détectable dans le vitré et/ou le LSR chez 12 patients traités sur 21. Les concentrations d'UDCA dans les liquides oculaires des patients traités étaient significativement supérieures à celles des patients témoins. Aucun patient témoin n'a présenté d'UDCA dans le LSR. Les concentrations d'UDCA dans le LSR étaient significativement corrélées à la concentration de protéines dans le LSR, et à l'extension du DR à baseline. La récupération visuelle à 6 mois était supérieure chez les patients chez qui UDCA avait été détecté dans les liquides oculaires, en comparaison avec ceux sans UDCA dans les liquides oculaires. De plus, la concentration d'UDCA dans le LSR était corrélée à

l'amélioration de l'acuité visuelle à 6 mois. La tolérance du médicament était bonne, et peu d'effets secondaires, uniquement légers et transitoires, ont été rapportés.

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé, au niveau expérimental, l'effet neuroprotecteur d'UDCA, aux concentrations retrouvées dans les liquides oculaires de patients, dans plusieurs modèles *ex vivo* de DR chez le rat. D'abord, nous avons mis en culture des explants de rétine de rat traités avec UDCA aux concentrations mesurées chez les patients (10 et 50 ng/ml) et à 10 fois cette concentration (500ng/ml). Des marqueurs de nécrose (LDH et RIP kinase) et d'apoptose (Caspase 3 et AIF), évalués par WB, étaient significativement diminués dans les explants traités par UDCA, notamment à 10 et 50 ng/ml. De plus, le nombre et la longueur des segments des photorécepteurs, quantifiés par immunomarquage dans des coupes de rétine et des montages à plat, étaient significativement supérieurs dans les explants traités à la dose de 10 ng/ml. Ensuite, nous avons testé l'effet neuroprotecteur d'UDCA et de TUDCA à la plus petite concentration de 10 ng/ml dans des explants soumis à un stress par l'albumine. La concentration d'albumine utilisée était la concentration maximale (12mg/ml) retrouvée dans le LSR prélevé chez les patients, afin de rapprocher ce modèle de DR aux conditions cliniques. Nous avons ainsi confirmé par WB que les marqueurs de mort cellulaire (LDH, RIP kinase, Caspase3) étaient significativement diminués dans les rétines traitées par UDCA ou TUDCA par rapport à des rétines non traitées. De même, la longueur des segments externes des photorécepteurs était plus importante dans les groupes traités.

Nous avons également étudié l'effet d'UDCA et TUDCA sur des lignées cellulaires de cônes humains mise en culture et soumises à un stress par l'albumine. Le pourcentage de cellules viables était significativement supérieur dans les cellules traitées, et la libération de LDH significativement inférieure, montrant ainsi plus spécifiquement la capacité neuroprotectrice contre la nécrose d'UDCA et TUDCA sur les photorécepteurs. Un effet direct sur les cônes est

possible car plusieurs des récepteurs des acides biliaires sont exprimés dans les cônes humains. Mais nos expériences à ce jour n'ont pas permis d'affirmer cette hypothèse.

Finalement, nous avons traité les explants de rétine avec les LSR prélevés chez les patients de l'étude clinique. Des marqueurs de mort tels que RIP kinase et AIF étaient significativement plus élevés dans les explants de rétine traités avec du LSR de patients contrôles que dans les explants de rétine traités avec du LSR provenant de patients traités, et contenant UDCA. En plus, l'ajout d'UDCA à 10 ng/ml aux LSR de patients témoins a permis de diminuer significativement ces marqueurs de mort cellulaire. L'activation de caspase 3 n'a pas été démontrée dans ce modèle, à la différence des deux modèles *ex vivo* mentionnés ci-dessus (explants mis en culture sans traitement ou traités par albumine).

Afin de mieux explorer les mécanismes d'action d'UDCA, nous avons réalisé une étude pan transcriptomique sur des neurorétines après 6 heures d'exposition à l'albumine et traités avec UDCA. 31 gènes ont été régulés positivement et 8 gènes ont été régulés négativement par l'UDCA plus l'albumine par rapport à l'albumine seule. La plupart de gènes différentiellement exprimés étaient impliqués dans la régulation de l'apoptose, la neurogenèse, la réponse inflammatoire et la protection contre le stress oxydatif.

En conclusion, nous avons démontré que :

- UDCA administré oralement en préopératoire, chez des patients atteints de DR, traversait la barrière hémato-rétinienne proportionnellement à l'étendue du DR et à l'importance de la rupture de la BHR, quantifiée par la mesure d'albumine dans le LSR.
- UDCA, aux concentrations retrouvées dans les liquides oculaires de patients, diminuait la mort cellulaire et protégeait la structure des photorécepteurs dans trois modèles *ex vivo* de DR chez le rat.

- L'albumine était neurotoxique pour les cônes et UDCA les préservait de la mort cellulaire.
- UDCA activait l'expression des gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose, la neurogenèse, l'inflammation, et le stress oxydative.

Note : Ce travail a fait l'objet de deux présentations orales :

- Congrès ARVO (*Association for Research in Vision and Ophthalmology*), Vancouver, Canada. Avril, 2019
- Congrès de la SFO (Société Française d'Ophtalmologie), dans cadre de la SFR (Société Française de Rétine), Paris, France. Mai, 2018

Oral Ursodeoxycholic acid can protect photoreceptors in retinal detachment

Alejandra Daruich,^{1,2,3} Thara Jaworski,¹ Hugues Henry,⁴ Marta Zola,³ Jenny Youale,¹ Léa Parienti,¹ Marie-Christine Naud,¹ Kimberley Delaunay,¹ Mathilde Bertrand,⁵ Marianne Berdugo,¹ Laura Kowalczyk,³ Alicia Torriglia,¹ Jeffrey Boatright,^{6,7} Emilie Picard,^{1†} Francine Behar-Cohen.^{1,8* †}

¹INSERM, UMRS1138, Team 17, From physiopathology of ocular diseases to clinical development, Université Sorbonne Paris Cité, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France.

²Ophthalmology Department, Necker-Enfants Malades University Hospital, AP-HP, Paris, France.

³Department of ophthalmology, University of Lausanne, Jules-Gonin Eye Hospital, Fondation Asile des Aveugles, Lausanne, Switzerland.

⁴Innovation and Development Laboratory, Clinical Chemistry Service, Lausanne University Hospital, 1011 Lausanne, Switzerland

⁵Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM), INSERM, CNRS, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Sorbonne Université, Pitié-Salpêtrière University Hospital, Paris, France

⁶Department of Ophthalmology, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA, USA. ⁷Center of Excellence, Atlanta Veterans Administration Medical Center, Decatur, GA, USA.

⁸Ophthalmopole, Cochin Hospital, AP-HP, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, 24 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

*corresponding author: Francine.behar@gmail.com

†These authors contributed equally to this work.

Abstract

Blindness mostly has a retinal origin and retinal detachment (RD) is a model disease for neuroprotection. Within hours after subretinal fluid (SRF) accumulation, photoreceptors, that ensure vision, die through mechanisms that recapitulate several retinal degenerative diseases.

Bile acids are neuroprotectant but only ursodeoxycholic acid (UDCA) is approved for clinical use in cholestasis. We have evaluated the ocular biodisponibility of UDCA, administered orally to patients before RD surgery. The level of UDCA in ocular media, correlated to detachment extension and to blood retinal barrier rupture, efficiently protected photoreceptors from apoptosis and necrosis in various *ex vivo* models of RD. Patients with UDCA detected in SRF had better visual recovery at 6 months after surgery and their SRF efficiently protected rat retinal explants from cell death. Pan transcriptomic analysis showed that UDCA not only induced anti-apoptotic genes but also anti-oxidant and anti-inflammatory genes. Oral UDCA should be evaluated as adjuvant therapy to surgery in RD.

Introduction

The neural retina, consisting in several layers of neurons and photoreceptors, lays on the retinal pigment epithelium (RPE) that ensures its attachment through active pumping mechanisms. The more frequent form of retinal detachment that results from a mechanical tearing of the neural retinal by vitreous traction (referred as rhegmatogenous, RD). It concerns 13.3 cases per 100,000 habitants in Europe (1). Detachment of the neural retinal from the RPE threatens the visual prognosis in RD since photoreceptor cell death begins as early as 12 hours after their physical separation from the RPE which provide, together with choroidal vessels, their metabolic support (2). Myopia, which incidence is increasing, is one of the major risk factors for RD in young patients (3). Although reattachment surgery is usually performed urgently, only two-fifths of patients with RD involving the macula recover 20/40 or better vision (4) due to photoreceptor cell death (5). Adjuvant to surgery, a neuroprotective therapy, targeting one or more mechanisms involved in photoreceptor cells

death could improve the visual outcome of patients operated for RD. In addition, because the mechanisms of photoreceptor cells death are multiple and includes apoptosis caspase-dependent, caspase independent, necrosis, autophagy, as well as activation of inflammation (2), retinal detachment is considered as a “model disease” allowing to study neuroprotective agents.

Primary bile acids (BA) are synthesized from cholesterol in the liver and excreted into the intestine, where gut microbiota converts primary BA into secondary hydrophilic BA by chemical modifications. The main function of BA is the emulsification, absorption and digestion of lipids. However, the secondary BA, ursodeoxycholic acid (UDCA) and tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), the taurine conjugate of UDCA, have also shown neuroprotective effects in neurogenerative and retinal diseases (6). In the retina, TUDCA demonstrated anti-apoptotic and anti-oxidants effects in a rat model of RD (7), and other models of photoreceptor degeneration such as the light-induced retinal damage and retinitis pigmentosa (8, 9). UDCA has never been evaluated in RD models, but showed improving effects on vascular integrity, anti-inflammation and endoplasmic reticulum stress in streptozotocin models of diabetic retinopathy (10, 11).

UDCA, unlike TUDCA, has FDA approval for the treatment of cholesterol gallstone dissolution and is currently considered the first choice therapy for several forms of cholestatic syndromes (12). Additionally, oral UDCA was shown to cross the blood brain barrier in a dose-dependent manner with excellent tolerance and safety when administered in patients with Amyotrophic lateral sclerosis (13). However, the ocular biodisponibility and tolerance of oral UDCA has never been evaluated in patients with retinal pathology. In this study, we have measured the level of UDCA in the subretinal fluid (SRF) of patients with RD after oral administration, have determined the neuroprotective concentrations of UDCA on *ex vivo* RD models, and have then demonstrated that such levels effectively protected photoreceptors from cell death and could have clinical benefit.

Results

Ocular concentrations of UDCA correlate with the extension of RRD and protein concentration in SRF

Twenty-six patients with RRD were included (Mean age= 62 years, Male/Female =17/9). Twenty-one patients received oral UDCA at different time intervals before vitrectomy for RD repair. Five patients served as the control group. Vitreous Humor (VH) and SRF were collected during surgery. Plasma samples were collected before and seven days after treatment. UDCA concentration in plasma did not differ between treated and control groups at baseline (14.6 ± 21.3 ng/ml vs 3.0 ± 6.7 ng/ml, $p= 0.1$, Mann-Whitney test), and increased significantly in treated group at 7 days (from 14.6 ± 21.3 ng/ml at baseline to 1363 ± 1087 ng/ml at 7 days $p<0.0001$, Mann-Whitney test) (Figure 1A). UDCA concentration in plasma at 7 days was significantly higher in treated patients compared with control patients (1363 ± 1087 ng/ml vs 15.3 ± 27.0 ng/ml, $p=0.0009$, Mann-Whitney test) (Figure 1A) witnessing treatment observance. The concentration of UDCA in ocular fluids was significantly higher in treated compared with control patients (13.5 ± 15.0 ng/ml vs 2.6 ± 5.8 ng/ml, $p= 0.047$, Mann-Whitney test) (Figure 1B). UDCA was found in SRF or VH in 12 of 21 treated patients ($n=4$ SRF, $n= 4$ VH, $n=4$ SRF and VH). The mean concentration in SRF was 28.2 ± 14.0 ng/ml (range= 12.9-49.0 ng/ml) and in VH it was 19.6 ± 9.9 ng/ml (range= 13.1-40.6 ng/ml). UDCA was not present in SRF of the 5 control patients, but in one VH. UDCA concentration in plasma at baseline did not influence the concentration of UDCA in ocular fluids ($p=0.43$, $r=0.2$, Spearman correlation). UDCA concentration in SRF was correlated with proteins concentration in SRF ($p<0.0001$, $r=0.8$, Spearman correlation) and with the extension of RD in clock hours at baseline ($p=0.013$, $r=0.5$, Spearman correlation) (Figure 1 C and D). Baseline protein concentration in SRF correlated with RD extension ($p=0.0002$, $r=0.7$, Spearman correlation) (Figure 1E-F). Mean protein concentration in SRF was 3.1 ± 2.9 mg/ml (range: 0.6-12.1 mg/ml). The time interval between oral UDCA intake and ocular fluids

sampling (range= 1.8-9.3 hours) did not influence the concentration of UDCA in ocular fluids ($p=0.29$, $r=0.1$, Spearman correlation). UDCA was well-tolerated and few mild side effects (flatulence, constipation, unpleasant taste) were more frequently reported in treated patients (Table S1 and S2). Five of 21 patients interrupted treatment before 4 months because of nausea, epigastric pain or tingling. Blood hepatic parameters remained within the normal ranges in all patients during the 6 months-follow up.

Patients with UDCA in ocular fluids had better visual outcome at 6 months after RD surgical repair

Baseline protein concentration in SRF was correlated with lower best-corrected visual acuity (BCVA) at baseline ($p=0.0004$, $r=0.5$, Spearman correlation) (Figure 2A), as well as with lower BCVA recovery 6 months after retinal detachment surgery ($p=0.0001$, $r=0.6$, Spearman correlation) (Figure 2B). Improvement in BCVA at 6 months was significantly higher in patients with UDCA levels measured in SFR or VH compared with those without detectable UDCA in the ocular media ($p=0.035$, Mann-Whitney test) (Figure 2C). Additionally, higher UDCA concentrations in SRF were correlated with higher BCVA improvement at 6 months ($p=0.04$, $r=0.6$, Spearman correlation) (Figure 2D).

UDCA, at concentrations ranges found in ocular samples of RD patients, exerts neuroprotective effects in a rat *ex vivo* model of RD

Neuroretinas freshly separated from RPE, placed on membranes with photoreceptors facing up, mimics relevant pathological features of RD (14). Retinal explants were treated with UDCA at 10 ng/ml, 50 ng/ml (concentration ranges found in patients) and 500 ng/ml (10 times the highest concentration found in patients) and cultured for 48 hours. Lactate dehydrogenase (LDH), a cytosolic enzyme early released after cell membranes breakdown into the culture medium, was significantly lower in medium from retinas treated with UDCA at 10 ng/ml and 50 ng/ml compared to control ($p=0.002$ and 0.046 respectively, Mann-

Whitney test), but not from those treated at 500 ng/ml (Figure 3A). Western blotting was used to quantify cell death pathway markers. The necroptotic protein, receptor-interacting protein (RIP) kinase was significantly reduced in retinas treated by UDCA at 10, 50 and 500 ng/ml as compared with control retinas ($p=0.029$, Mann-Whitney test) (Figure 3B).

Lysosomal membrane-associated protein (LAMP2), a protein protecting the lysosomal membrane, was significantly higher only in retinas treated by UDCA at 10 and 50 ng/ml compared with control retinas ($p=0.029$, Mann-Whitney test) (Figure 3C). The apoptotic protein cleaved-Caspase 3 was significantly reduced in retinas treated by UDCA at 10 ($p=0.028$, Mann-Whitney test) and 50 ng/ml ($p=0.014$, Mann-Whitney test), but not at 500 ng/ml (Figure 3D). Similarly, apoptosis-inducing factor (AIF), a caspase-independent death effector, was significantly lower in retinas treated by UDCA at 10 and 50 ng/ml ($p=0.029$, Mann-Whitney test) compared with control retinas, but not in those treated at 500 ng/ml (Figure 3E).

One of the earlier morphological markers on the detached neurosensory retina is the shortening of the outer segments of photoreceptors. UDCA at the lowest concentration of 10 ng/ml significantly preserves photoreceptors revealed by immunostaining on retinal sections and flat-mounted retina. Rod segments length labeled by Rho4D2 on retinal sections was significantly higher in treated retinas compared with control retinas ($p=0.029$, Mann-Whitney test) (Figure 3F). Additionally, the number of cone segments, labeled on flat-mounted retinas with peanut agglutinin was significantly higher in treated retinas compared to control ones ($p=0.029$, Mann-Whitney test) (Figure 3G).

UDCA, at the lowest concentration measured in ocular samples from RD patients, was neuroprotectant in albumin-exposed rat retinal explants

Higher protein concentration in SRF correlated with lower visual outcome after successful surgical repair, suggesting that protein could exert neurotoxic effect on the retina. To confirm this hypothesis and to reproduce more accurately the human pathology, rat retinal explants

were exposed to the maximal albumin concentration (12 mg/ml) measured on SRF of RRD patients. Significantly increased apoptosis and necrosis markers (cleaved caspase 3, LDH, RIP) were measured in rat neuroretina exposed to albumin compared to control explants without albumin (Figure S1A-C). Then, the effect of UDCA or TUDCA at 10 mg/ml were tested on rat retinal explants exposed to albumin (12mg/ml). Both drugs significantly reduced LDH release ($p=0.04$ and $p=0.02$ respectively, Mann-Whitney test) as compared to albumin exposure alone (Figure 4A). RIP kinase was significantly lower in retinas treated with UDCA ($p=0.02$, Mann-Whitney test) and TUDCA ($p= 0.008$, Mann-Whitney test) compared to controls (Figure 4B), as well as, cleaved-Caspase 3 ($p=0.008$ and $p=0.004$, for UDCA and TUDCA respectively, Mann-Whitney test) (Figure 4C), demonstrating that markers of both necrosis and apoptosis were significantly reduced by 10mg/ml of both UDCA and TUDCA. Additionally, rod segments length labeled by Rho4D2 was significantly higher in UDCA and TUDCA treated retinas compared with untreated retinas ($p=0.01$ and 0.03 respectively, Mann-Whitney test)(Figure 4D).

UDCA and TUDCA protected human cones from albumin-induced photoreceptor cell death *in vitro*

Since cones, concentrated in the fovea ensure visual acuity, we tested more specifically the effect of albumin on WERI-Rb-1 human cone cell line, showing an albumin dose-dependent decrease of mitochondrial activity (Figure S1D). Albumin at 20 g/L induced a decrease of 40% on mitochondrial activity at 24 hours (Figure S1D). UDCA and TUDCA at increasing concentrations (1, 5 and 10 μM) 1 hour before albumin exposure and during albumin exposure significantly increased the mitochondrial activity at 1 and 5 μM (59% \pm 6, mean increase of 11%, $p=0.004$, and 59% \pm 3 mean increase of 11%, $p=0.01$, for UDCA and 67% \pm 4, mean increase of 19%, $p=0.001$ and 64% \pm 1, mean increase of 16%, $p=0.01$, for TUDCA, respectively, Mann-Whitney test) compared to albumin alone. TUDCA shows higher percentages of viable cells at 1 ($p=0.01$, mean of 8% higher, Mann-Whitney test) and 5

μM ($p=0.03$, mean of 5% higher, Mann-Whitney test) compared to UDCA (Figure 4E). LDH release, was significantly lower when cones were previously treated with 1, 5 and 10 μM of UDCA ($p=0.03$ for all concentrations, Mann-Whitney test) or with TUDCA ($p=0.03$ for all concentrations, Mann-Whitney test), without significant differences between the two molecules (Figure 4F). The expression of bile acids receptors, as glucocorticoid receptor (GR) mineralocorticoid receptor (MR), Takeda G-protein coupled receptor 5 (TGR5) and sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2) were confirmed by rt-PCR on WERI-Rb-1 human cone cell.

Exposure of rat retinal explants to SRF from patients with RD

Finally, rat retinal explants were incubated with SRF of RD patients collected at the time of surgery. SRF from control patients (non-treated with UDCA) induced cell death makers.(Figure S1A-C). The addition of UDCA at 10mg/ml in the SRF from control RD patients significantly reduced markers of necrosis (RIP, $p= 0.03$, Mann-Whitney test) and caspase-independent apoptosis (AIF, $p= 0.03$, Mann Whitney test) (Figure 5 A et B). The cleaved-caspase 3 form was not found in this model. Finally, rat retinal explants were incubated with the SRF collected from patients who were treated with UDCA prior to surgery and in which UDCA levels were measured (mean UDCA Concentration:). Cell death, quantified by LDH release was significantly reduced when explants were treated with SRF from UDCA-treated patients as compared to SRF from control patients ($p=0.02$, Mann-Whitney test) (Figure 5 C). RIP kinase and AIF were also significantly lower in retinas incubated with SRF from UDCA-treated patients ($p= 0.001$ and $p=0.03$, respectively, Mann-Whitney test) (Figure 5 D and E).

Molecular signature of UDCA and TUDCA in albumin-exposed rat retinal explants

The transcriptomic regulations induced by UDCA were analyzed on rat retinal explants exposed for 6 hours to albumin at the maximal dose found in the SRF from RD patients

(12mg/ml) in order to mimic the subretinal toxic microenvironment. UDCA at 10 ng/ml induced a significant regulation of 38 genes, 31 were up-regulated and 7 were down-regulated (Figure 6). Enriched analysis showed that hallmark gene sets were mostly implicated in apoptosis regulation, neurogenesis, inflammatory response and oxidative-stress (Fig 6 and Data File S1), which could mediate the observed biologic effects. Genes up regulated by UDCA such as *Phlda1* (15), *Gdf15*(16), *Tars*(17), *Asns* (18), *Pfkfb3*(19), *Chka* (20), *CD24* (21), *Hmox1*(22) and *Sphk1* (23), encode proteins involved in anti-apoptotic pathways, while Adenylate Cyclase Activating Polypeptide 1 (*Adcyap1*) (24), *Atf3*(25), *Mt2A* (26), *Il4i1*(27) and *Egr1* (28) encode proteins promoting neuroregeneration. *Myc* , *Edn2*, *Gadd45 b* and *Gadd45g* , encode proteins involved in both survival pathways in the retina (29, 30) and in neuroregeneration (31–33). *Hmox 1*(34), *Mt2A* (35) encoding proteins with anti-oxidant properties were also up-regulated. On the other hand, UDCA also up-regulated genes implicated in inflammatory response regulation such as *Il27*(36), *Il4i1* (37), *Atf3*(38), *Cebpb*(39), *Gdf15* (40), *Zfp36* (41) *Hmox1* (42) and *Nr4A1*(43).

Discussion

Despite high surgical repair rate, RRD remains a vision-threatening condition. Within hours after SRF accumulation, photoreceptors die through several cell death mechanisms. Various molecular components of SRF could exert toxicity on these retinal neurons (14, 44), that in physiologic conditions are maintained in a confined and controlled microenvironment by blood retinal barriers. With increased RD duration, SRF protein concentration increases (45) and visual prognosis worsens (46), but the direct effect of proteins on photoreceptors has not been evaluated. In the present study, protein concentration in SRF, which correlated with extension of the detachment, also correlated with worse baseline and post-surgery visual outcome at 6 months. In addition, we showed that albumin reduced the viability of retinal explants and cultured human cone photoreceptors, suggesting a direct toxic effect of albumin. Similarly, Liu *et al.* showed that cortical neurons are damaged by albumin uptake (47). By

adding albumin, at the concentration measured in SRF from patients, to retinal explants, where the neuroretina is separated from the RPE, we intended to create an *ex vivo* RD model closer to the human clinical disease, in order to evaluate the neuroprotective properties of bile acids.

UDCA, the first line therapy for cholestatic liver diseases (12) has shown beneficial neuroprotective effects in various animal models of retinal diseases (6), but the ocular biodisponibility of oral UDCA had never been evaluated, limiting its clinical use. In this translational study, we demonstrated that in human, oral UDCA can cross the blood retinal barriers when the retina is detached. UDCA concentrations in ocular fluids positively correlated with the extension of the RRD and with the protein concentration in the SRF, suggesting that blood retinal barrier-breakdown is the main factor influencing the ocular biodisponibility of UDCA administered orally at 10 mg/kg/day. Similarly, in patients with Amyotrophic lateral sclerosis (13), a condition in which the blood brain barrier is compromised (48, 49), oral UDCA, administered at doses ranging from 15 to 50 mg/kg/day, crossed the blood brain barrier in a dose-dependent manner. At the dose of 10 mg/kg/day, the tolerance and safety of oral UDCA was confirmed in our study, with only mild gastrointestinal tract adverse effects, as previously reported (13).

Although UDCA efficacy in RD was not the primary objective of the study, after successful surgical repair, the functional outcome was better for patients in whom UDCA was dosed in ocular fluids. Moreover, elevated UDCA levels in SRF correlated with better visual acuity gain at 6 month post-surgery. Interestingly, patients with more extended RRD and higher protein level in SRF, expected to have a worse visual outcome, had an increased UDCA passage in SRF and a significant better visual gain at 6 months, suggesting a potential neuroprotective effect of UDCA.

In order to explore the possible benefit of UDCA, and its mechanisms of action on cell death induced by RD, several protocols were conducted. UDCA, at the low concentration of 10 ng/ml, measured in SRF of patients, did protect the neuroretina from necrosis and from

caspace-dependent and -independent cell death, as shown by the decrease of LDH release, RIP kinase activation, caspase 3 cleavage and AIF. UDCA also increased LAMP2 which intervenes in autophagy (50). The increase of LAMP2 could be protective for retinal neurons as it was recently shown that LAMP2-deficient neurons are more susceptible to oxidative stress-induced injury (51), an important pathogenic mechanism in RD (14, 52). At low dose, UDCA also preserved the integrity of photoreceptor outer segments, which is recognized as a major visual prognosis factor in patients with RD (5, 53). In the presence of albumin, which enhances the cellular stress, UDCA was still efficient to reduce apoptosis and necrosis and to protect photoreceptor integrity. The protective effect of TUDCA, previously demonstrated (7), was confirmed in this *ex vivo* model with controlled dosing. TUDCA protected against caspase activation in an *in vivo* RD model (7) and several models of photoreceptor degeneration (8), and against non-caspase dependent mechanisms involving AIF in retinal cells exposed to glucose (54). However, the respective role of taurine, the most abundant and neuroprotective amino acid in the retina (55) and of UDCA, have not been previously evaluated. Our results show that UDCA, that does not contain taurine, protected from apoptosis, but also from necrosis. Finally, the SRF collected from patients with best postoperative visual outcome did protect rat retinal explants from cell death, confirming that efficient UDCA levels were reached after oral administration. Interestingly, when rats retinal explants were exposed to SRF, caspase-dependent cell death activation was not observed, suggesting that SRF could have anti-apoptotic properties and caspase-dependent apoptosis could be not involved in human RRD. Although enzymatic activities of caspases have been reported in experimental models of RD (7), caspase inhibition by a pan-caspase inhibitor fails to prevent photoreceptor loss (2). Implication of caspase-dependent apoptosis in RRD should be further explored.

Bile acid receptors have been described in liver, intestine and brain, and includes nuclear receptors (Farnesoid X receptor (FXR), Vitamin D receptor, Pregnane X receptor, GR and MR) and membrane receptors (TGR5, Sphingosine 1-phosphate receptor 2 and $\alpha 5\beta 1$

Integrin) (56). All these receptors, at the exception of FXR, have been identified in the retina, but specific interaction has only been reported for TUDCA and TRG5 in retinal ganglion cells (57) and whether UDCA effects were mediated by these receptors cannot be ascertained. Cultured cone photoreceptors that express most bile acid receptors were also protected from necrosis by both UDCA and TUDCA.

UDCA induced the transcriptomic regulation of genes encoding proteins with anti-oxidant activities. *Hmox1* that encodes heme oxygenase-1, significantly up-regulated by UDCA, showed neuroprotection in the retina against oxidative stress injury (34), optical nerve section (58) and diabetic conditions (59). In addition, the overexpression of heme oxygenase 1 in a mouse model of RD protected photoreceptors from apoptosis (22). *Mt2A* which encodes metallothionein 2A protein, protecting against hydroxyl free radicals and from metal ions toxicity, preserved from various form of retinal degeneration (35). ATF3, upregulated by UDCA, is a member of the cAMP-response element binding protein family, that was upregulated in models of retinal and optic nerve regeneration (25) and a mutant *atf3* mice showed reduced nerve regeneration (60). Other genes, up-regulated by UDCA also encode proteins with potential neuroprotectant effects. *Adcyap1*, which encodes pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), was shown to carry neuroprotective properties in retinal degeneration and optic nerve crush models (24, 61). Endothelin 2, upregulated by UDCA, showed protection of mutant photoreceptors in inherited photoreceptor degeneration (62), and against light-damage (63). UDCA also up-regulated CD24, a cell surface receptor expressed in photoreceptor precursors (64) and *Chac1*, which encodes a member of the gamma-glutamylcyclotransferase family of proteins, shown to promote neuronal differentiation and to regulate glutathione levels (65). Many genes involved in cell death were regulated, but more importantly genes encoding anti-apoptotic proteins such as *Tars*, *Myc*, *Adcyap1*, *Asns*, *Hmox1* and *Pfkfb3*, and the anti-necrotic protein *Hmox1* were up-regulated, identifying some of the potential mechanisms of action of UDCA. Interestingly, *Il27*, that was upregulated, promotes the expression of the anti-oxidative protein CFH and reduces

inflammation through IL10 expression in the retina (36, 66). Altogether, these results indicate that through transcriptional effect, UDCA regulates not only cell death pathways but also retinal regeneration and inflammatory pathways.

In conclusion, UDCA, taken orally before surgical repair for RRD gets into the eye proportionally to the extent of blood retinal barrier rupture. It reaches neuroprotective concentrations, that efficiently reduce cell death and preserve photoreceptor integrity. UDCA induces retinal genes with anti-oxidant, anti-apoptotic and anti-inflammatory properties.

These results prompt to evaluate oral UDCA as adjuvant treatment to surgery in RD patients.

Materials and Methods

Clinical study

This interventional, non-randomized, open label, clinical trial (ClinicalTrials.gov: NCT02841306) was designed in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the Swiss Federal Department of Health (Authorization CER-VD n° 2016-00644). Twenty-six consecutive patients presenting with rhegmatogenous retinal detachment for more than 4 days from symptoms onset were prospectively included between July 2017 and September 2017 at Jules-Gonin Eye Hospital. Exclusion criteria included: age <18 years or >90 years, monophthalmic patients, history of vitrectomy, vitreous bleeding or other associated retinal disease, and any condition or treatment contraindicating the administration of oral UDCA (pregnancy and lactation, peptic ulcer, acute or chronic liver disease, acute infection of the gallbladder and biliary tract, repeated biliary colic, Crohn's disease, ulcerative colitis, or other disease of the small intestine and colon, galactose intolerance, the Lapp lactase deficiency or glucose and galactose malabsorption, hypersensitivity, treatment by Cholestyramine, Colestipol and Antacids containing aluminum hydroxide or magnesium, Cyclosporine, Ciprofloxacin, Nitrendipine or Dapsone). Baseline examination included complete ophthalmological examination, ETDR assessment of best-corrected visual acuity, color fundus photography and SD-OCT. Extension

of RRD in clock hours was determined according to fundus examination and fundus photography. Blood sample for UDCA determination (400 μ L) were collected at baseline and day 7 and immediately centrifugated (twice at 2,000 g) for plasma extraction and congelation at -80°C . Blood samples to test hepatic parameters (Aspartate aminotransferase, AST (SGOT), Alanine aminotransferase, ALT (SGPT), Alkaline phosphatase ALP and Gamma glutamyl-transpeptidase, γ –GT) were collected at baseline, day 7, monthly during 4 months and at 6 months. Oral UDCA (Ursochol®, 300 mg, Zambon Switzerland Ltd.) was administered at 10mg/kg/day before surgery at different intervals (4 groups of 5 or 6 patients: 3-5 hours, 6-8 hours, 9-11 hours or >12 hours) and after surgery (two-intake/day) during 4 months. Five patients were not treated and served as control group. Standard 23G pars plana vitrectomy, laser or cryotherapy and gas or silicone tamponade was performed in all patients. Ocular samples were collected during surgery. Undiluted VH was collected by manual aspiration through a syringe connected to a 23-gauge vitrectomy cutter (before infusion opening; Alcon, Rotkreuz ZG, Switzerland). SRF was collected by active aspiration through a retinal tear with the vitrectomy cutter. Samples were coded and stored in a biobank at -80°C . Follow-up visits were performed at day 1 and 7, monthly during 4 months and at 6 months after surgery and included a complete ophthalmological examination, color fundus photography, SD-OCT, microperimetry and a questionnaire patient-reported tolerance and occurrence of adverse events (Table S2).

UDCA and protein mesure in ocular and plasma samples

Bile acids (n = 28) were measured by isotope-dilution high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (LC-MS HR). Each sample (50 μ L) was combined with the internal standards in methanol (100 μ L) and H₂O with 0.2 % formic acid (600 μ L) was added. Sample extraction and clean-up were performed using 96-well HLB SPE plates. Bile acids were separated via the method LC gradient within 22 min and measured by high resolution MS. Quantification was based on peak area ratios

interpolated against a seven-point calibration curve. The LC-MS HR system (QExactive Orbitrap mass spectrometer) was run using XCalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific). Data files were processed into result files using TraceFinder 3.0 (Thermo Fisher Scientific). Peak areas of target components were realized by auto-integration. The validated result file (TraceFinder 3.0) was exported in an Excel file format.

Protein concentration in SRF was calculated using the Micro BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific, Cergy Pontoise, France).

Cell line and *in vitro* model

WERI-Rb-1 human cone cell line were cultured on Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium (Thermo Fisher Scientific, Cergy Pontoise, France), supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin. In order to determine the concentration of albumin needed to induce a significant cell death, WERI-Rb-1 human cones were treated with concentrations of albumin (Bovine Serum Albumin, Sigma Aldrich Chemical Co, Saint-Quentin en Yvelines, France), from 2.5 to 40 g/L (n=4/group) and cultured during 24 hours. To determine the neuroprotective effect of UDCA and TUDCA, WERI-Rb-1 human cones were treated by 1, 5 and 10 μ M of UDCA or TUDCA (n=4-8/group) 1 hour before to add albumin at 20mg/mL. After 24 hours of culture, 400 μ l of medium was collected for Lactate dehydrogenase (LDH) assay. CellTiter was added to the cells and incubated for 2 hours. The absorbance was read at 492 nm. LDH release was assessed in medium to determine cytotoxicity as previously described (Sigma Aldrich Chemical Co, Saint-Quentin en Yvelines, France).⁽¹⁴⁾ CellTiter (CellTiter 96® AQueous One Cell Proliferation Assay Solution, Promega Corporation, CHARBONNIERES, France), was used to assessed mitochondrial activity. The results were calculated on percentage by reporting the absorbance of cells by group to the mean of the control group.

Animals and *ex vivo* models of RD

Adult male Wistar rats (JANVIER LABS, Le Genest St Isle, France, n= 59) were fed with a standard laboratory diet and ad libitum tap water in a room maintained at 21° to 23°C with a 12-hour light/12-hour dark cycle (6 a.m. to 6 p.m.) during 7 days before to be sacrificed by carbon dioxide inhalation.

Retinal explants were created to mimic retinal detachment conditions. Neuroretinas were dissected from fresh enucleated eyes, separated from the retinal pigment epithelium, divided into two parts, and transferred to 0.2-mm polycarbonate membranes (Millipore, Saint Quentin En Yvelines, Fr) with the photoreceptor layer facing up (14). The membranes were placed into a six-well culture plate containing Dulbecco's modified Eagle's medium (Thermo Fisher Scientific, Cergy Pontoise, France) and 3% fetal bovine serum (3.9 ml/well). Three different models were used: spontaneous cell death, albumin-induced cell death and SRF-induced cell death. First, in the spontaneous cell death model, 100 µL of vehicle or UDCA (Sigma Aldrich) at a final concentration of 10, 50 or 500 ng/ml were added to the photoreceptor side of the explants (upper chamber) (n= 4/group). Secondly, in the albumin-induced cell death model, 100µL of albumin (Bovine Serum Albumin, Sigma Aldrich) at 12 mg/ml, alone or containing UDCA or TUDCA (Sigma Aldrich) at 10 ng/ml were added to the upper chamber (n=5/group). Finally, in the SRF-induced cell death model, 100 µL of SRF from patients operated of retinal detachment were added to the upper chamber. SRF from control (n=5) and SRF from oral UDCA treated patients (with UDCA found in SRF, n=8) were pooled before to be added to the retinal explants. Five groups were compared: SRF from control patients (n=9), SRF from control patients with addition of UDCA (n=5) or TUDCA (n=5) at 10 ng/ml and SRF from oral UDCA treated patients (n=5).

The concentration of UDCA, TUDCA and albumin were chosen according to the concentrations ranges found in the SRF of patients and serial dilution were performed to reach the final concentrations in the entire volume of the well (4ml). The dilutions of UDCA, TUDCA or vehicle were successively performed on ethanol 100% (10 mg/ml), phosphate

buffered saline (PBS), and three times medium (the same prepared for the culture wells). In the albumin-induced cell death model, albumin was added at the last dilution. In the SRF-induced cell death model the two last dilution on the medium were not performed and dilutions were made directly on the SRF. Treated explants were cultured during 48 hours in spontaneous cell death model and 6 hours in the induced cell death models. LDH release were measured in medium collected from the lower chamber. Immunohistochemistry and Western blotting were performed on explants as described below.

Western Blotting analysis

Explants (n = 4 or 5 per group) were lysed MPER buffer (Thermo Fisher Scientific) and then centrifuged at 13,000 g for 5 minutes at 4°C. Protein concentrations were calculated using the Micro BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific). Five to 10 mg of total extract was mixed with protein loading buffer (Thermo Fisher Scientific) as per the manufacturer's instructions. Samples were loaded onto 4 to 12% bis-tris gel (Thermo Fisher Scientific), and proteins were transferred onto nitrocellulose membranes. Nonspecific binding was blocked with 5% nonfat dry milk in Tween/tris-buffered saline, and then membranes were incubated overnight at 4°C with the primary antibody against caspase 3 (1:500; Clone C92-605, BD Transduction Laboratories, CliniSciences, Nanterre, France), RIP (1:500; clone 38, BD Transduction Laboratories), AIF (E-1) (1:500, Sc-13116, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), LAMP2 (1:1000, clone ABL-93, Sigma Aldrich) or actin (1:4000; Sigma-Aldrich), followed by incubation with the supplier-recommended dilution of horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 hour (Vector Laboratories, Eurobio, Les Ulis, France). Protein bands were visualized by an enhanced chemiluminescence reaction (Thermo Fisher Scientific) using a Bioimaging system (MicroChemi 4.2, Berthold, France or Invitrogen iBright Imaging Systems, Thermo Fisher Scientific). The gray values of specific bands were quantified using ImageJ, and the protein signals of interest were reported relative to the actin signal or to their respective cleaved form (for caspase 3) for each sample.

Immunohistochemistry and fluorescence intensity evaluation

Sections of retinal explants.

Explants were rinsed in 1× phosphate-buffered saline, fixed for 20 min with 4% paraformaldehyde (Inland Europe, Conflans sur Lanterne, France), infiltrated in a sucrose gradient series, and then mounted in Tissue-Tek optimum cutting temperature (OCT) (Siemens Medical, Puteaux, France). Immunohistochemistry was performed on 10- μ m-thick sections. Primary antibodies anti-rhodopsin (Rho4D2, Abcam) and the corresponding Alexa-conjugated secondary antibody (Thermo Fisher Scientific) were used, and sections were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich).

The sections were photographed with a fluorescence microscope (BX51, Olympus, Rungis, France) using identical exposure parameters for all compared samples. Blind quantifications were realized on photographs acquired at 40× magnification with ImageJ software.

Measurement of the outer segments length was performed in 8 photographs/explant, by measuring at three equidistant points on each photograph. The mean was then calculated for each explant (n= 4 explant/group).

Flat-mounted retinal explants.

Explants were rinsed in 1× phosphate-buffered saline, fixed for 20 min with 4% paraformaldehyde (Inland Europe, Conflans sur Lanterne), and permeabilized with PBS/5% Triton/5% fetal bovine serum for 45 min. Incubation with the primary antibody (1/1000 Peanut Agglutinin, PNA-FITC, Sigma Aldrich) was performed overnight at 4°C. DAPI (Sigma-Aldrich) staining was performed by incubation during 20 min. Explants were flat-mounted between a slide and a coverslip using mounting medium (Fluoromount, Dako supplied by Agilent Technologies France, Les Ulis, France). The flat-mounted explants were photographed at 40× magnification with a fluorescence microscope (BX51, Olympus, Rungis, France) using identical exposure parameters for all compared samples (6 photographs/

explants). Blind quantifications of PNA positive cells were realized on acquired photographs with ImageJ software.

Real-time reverse transcription polymerase chain reaction

Cell pellet (n = 5 per group) were directly frozen until RNA isolation with a RNeasy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocols. RNA concentration, purity were determined with an NanoPhotometerTM (IMPLEN, Science Tec, Courtaboeuf, France). First-strand cDNA was generated by reverse transcription using total RNA and a SuperScript IV Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific). Quantitative PCR using duplicate technical replicates was performed on a Quant Studio 5 PCR System (Thermo Scientific) using SYBR Green gene expression assay probes (QuantiTech Primer Assay, Qiagen) of the human target genes sphingosine-1-phosphate receptor 2 (*SIPR2*, NM_004230; QT00230846), nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor) (*NR3C1*, NM_000176; QT00020608), nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2 (mineralocorticoid receptor) (*NR3C2*, NM_000901; QT000028490), g protein-coupled bile acid receptor 1 (*GPBAR1*, NM_001077191; QT000209594), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*, NM_001256799; QT00079247) and QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Scientific). The expression levels of individual genes were normalized with *GAPDH* in the same sample by calculation of the ΔC_t value, and relative quantification was performed using the $\Delta\Delta C_t$ method with condition without albumin and UDCA or TUDCA as a control.

RNA sequencing and RNA-seq data analysis

Retinas (n = 3 per group) were frozen immediately after isolation. Total RNA was extracted using a Precellys homogenizer (Ozyme, Bertin) and an RNeasy Mini kit (Qiagen). Quality of raw data has been evaluated with FastQC. Poor quality sequences has been trimmed or removed with Trimmomatic software to retain only good quality paired reads. Star v2.5.3a

has been used to align reads on reference genome using standard options. Quantification of gene and isoform abundances has been done with rsem 1.2.28, prior to normalisation on library size with DESeq2 bioconductor package. Finally, differential analysis has been conducted with edgeR bioconductor package. Multiple hypothesis adjusted p-values were calculated with the Benjamini-Hochberg procedure to control FDR. Two samples were removed in albumin group and in UDCA group. Log₂ fold-change threshold was set to 0,5 and the FDR threshold to 0,05. At least 30% of samples per group respect a minimum CPM threshold of 1. Enrichment analysis has been performed with GSEA (Gene Set Enrichment analysis). Protein-protein interactions has been reconstructed with String (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes). The tool was used with a minimum required interaction score of 0,7 and the maximum number of interactors to show was set to 10. The final network connecting the differentially expressed genes with the pathways was obtained with cytoscape.

Statistical analyses

Results are presented as the mean \pm SEM. Analyses were performed using GraphPad (version 5.0f, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Nonnormally distributed data were analyzed using a nonparametric Mann-Whitney test to compare the two groups. Spearman correlation coefficients were used to investigate association between variables. The logarithm of the minimal angle of resolution (LogMAR) was used to calculate visual acuity means. P values < 0.05 were considered statistically significant.

References

1. J. Q. Li, T. Welchowski, M. Schmid, F. G. Holz, R. P. Finger, Incidence of Rhegmatogenous Retinal Detachment in Europe - A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ophthalmologica*, 1–6 (2019).
2. Y. Murakami, S. Notomi, T. Hisatomi, T. Nakazawa, T. Ishibashi, J. W. Miller, D. G. Vavvas, Photoreceptor cell death and rescue in retinal detachment and degenerations. *Prog Retin Eye Res*. **37**, 114–140 (2013).
3. M. S. Kim, S. J. Park, K. H. Park, S. J. Woo, Different Mechanistic Association of Myopia with Rhegmatogenous Retinal Detachment between Young and Elderly Patients. *Biomed Res Int*. **2019**, 5357241 (2019).
4. R. V. Campo, J. O. Sipperley, S. R. Sneed, D. W. Park, P. U. Dugel, J. Jacobsen, R. J. Flindall, Pars plana vitrectomy without scleral buckle for pseudophakic retinal detachments. *Ophthalmology*. **106**, 1811–1815; discussion 1816 (1999).
5. A. Matsui, H. Toshida, R. Honda, T. Seto, T. Ohta, A. Murakami, Preoperative and Postoperative Optical Coherence Tomography Findings in Patients with Rhegmatogenous Retinal Detachment Involving the Macular Region. *ISRN Ophthalmology*. **2013**, 1–6 (2013).
6. A. Daruich, E. Picard, J. H. Boatright, F. Behar-Cohen, The bile acids urso- and tauroursodeoxycholic acid as neuroprotective therapies in retinal disease. *Molecular Vision* (2019).
7. D. Mantopoulos, Y. Murakami, J. Comander, A. Thanos, M. Roh, J. W. Miller, D. G. Vavvas, Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) protects photoreceptors from cell death after experimental retinal detachment. *PLoS ONE*. **6**, e24245 (2011).
8. J. H. Boatright, A. G. Moring, C. McElroy, M. J. Phillips, V. T. Do, B. Chang, N. L. Hawes, A. P. Boyd, S. S. Sidney, R. E. Stewart, S. C. Minear, R. Chaudhury, V. T. Ciavatta, C. M. P. Rodrigues, C. J. Steer, J. M. Nickerson, M. T. Pardue, Tool from ancient pharmacopoeia prevents vision loss. *Mol. Vis*. **12**, 1706–1714 (2006).
9. B. C. Oveson, T. Iwase, S. F. Hackett, S. Y. Lee, S. Usui, T. W. Sedlak, S. H. Snyder, P. A. Campochiaro, J. U. Sung, Constituents of bile, bilirubin and TUDCA, protect against oxidative stress-induced retinal degeneration. *J. Neurochem*. **116**, 144–153 (2011).
10. Y.-R. Chung, J. A. Choi, J.-Y. Koh, Y. H. Yoon, Ursodeoxycholic Acid Attenuates Endoplasmic Reticulum Stress-Related Retinal Pericyte Loss in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *J Diabetes Res*. **2017**, 1763292 (2017).
11. H. Ouyang, X. Mei, T. Zhang, B. Lu, L. Ji, Ursodeoxycholic acid ameliorates diabetic retinopathy via reducing retinal inflammation and reversing the breakdown of blood-retinal barrier. *Eur. J. Pharmacol*. **840**, 20–27 (2018).
12. M. Wagner, P. Fickert, Drug Therapies for Chronic Cholestatic Liver Diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (2019), doi:10.1146/annurev-pharmtox-010818-021059.
13. G. J. Parry, C. M. P. Rodrigues, M. M. Aranha, S. J. Hilbert, C. Davey, P. Kelkar, W. C. Low, C. J. Steer, Safety, tolerability, and cerebrospinal fluid penetration of ursodeoxycholic Acid in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neuropharmacol*. **33**, 17–21 (2010).
14. A. Daruich, Q. Le Rouzic, L. Jonet, M.-C. Naud, L. Kowalczyk, J.-A. Pournaras, J. H. Boatright, A. Thomas, N. Turck, A. Moulin, F. Behar-Cohen, E. Picard, Iron is neurotoxic in retinal detachment and transferrin confers neuroprotection. *Sci Adv*. **5**, eaau9940 (2019).
15. M. A. NAGAI, Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 (PHLDA1) and cancer. *Biomed Rep*. **4**, 275–281 (2016).
16. P. J. Emmerson, K. L. Duffin, S. Chintharlapalli, X. Wu, GDF15 and Growth Control. *Front Physiol*. **9**, 1712 (2018).
17. D. Habibi, N. Ogloff, R. B. Jalili, A. Yost, A. P. Weng, A. Ghahary, C. J. Ong, Borrelidin, a small molecule nitrile-containing macrolide inhibitor of threonyl-tRNA synthetase, is a potent inducer of apoptosis in acute lymphoblastic leukemia. *Invest New Drugs*. **30**, 1361–1370 (2012).
18. H. Cui, S. Darmanin, M. Natsuisaka, T. Kondo, M. Asaka, M. Shindoh, F. Higashino, J. Hamuro, F. Okada, M. Kobayashi, K. Nakagawa, H. Koide, M. Kobayashi, Enhanced expression of asparagine synthetase under glucose-deprived conditions protects pancreatic cancer cells from apoptosis induced by glucose deprivation and cisplatin. *Cancer Res*. **67**, 3345–3355 (2007).

19. A. Yalcin, B. F. Clem, Y. Imbert-Fernandez, S. C. Ozcan, S. Peker, J. O'Neal, A. C. Klarer, A. L. Clem, S. Telang, J. Chesney, 6-Phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) promotes cell cycle progression and suppresses apoptosis via Cdk1-mediated phosphorylation of p27. *Cell Death Dis.* **5**, e1337 (2014).
20. N. D. Ridgway, The role of phosphatidylcholine and choline metabolites to cell proliferation and survival. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **48**, 20–38 (2013).
21. M. Parlato, F. Souza-Fonseca-Guimaraes, F. Philippart, B. Misset, Captain Study Group, M. Adib-Conquy, J.-M. Cavaillon, CD24-triggered caspase-dependent apoptosis via mitochondrial membrane depolarization and reactive oxygen species production of human neutrophils is impaired in sepsis. *J. Immunol.* **192**, 2449–2459 (2014).
22. M.-P. Shyong, F.-L. Lee, W.-H. Hen, P.-C. Kuo, A.-C. Wu, H.-C. Cheng, S.-L. Chen, T.-H. Tung, Y.-P. Tsao, Viral delivery of heme oxygenase-1 attenuates photoreceptor apoptosis in an experimental model of retinal detachment. *Vision Res.* **48**, 2394–2402 (2008).
23. N. C. Hait, C. A. Oskeritzian, S. W. Paugh, S. Milstien, S. Spiegel, Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* **1758**, 2016–2026 (2006).
24. A. Vaczy, P. Kovari, K. Kovacs, K. Farkas, E. Szabo, T. Kvarik, B. Kocsis, B. Fulop, T. Atlasz, D. Reglodi, Protective Role of Endogenous PACAP in Inflammation-induced Retinal Degeneration. *Curr. Pharm. Des.* **24**, 3534–3542 (2018).
25. K. E. Saul, J. R. Koke, D. M. García, Activating transcription factor 3 (ATF3) expression in the neural retina and optic nerve of zebrafish during optic nerve regeneration. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* **155**, 172–182 (2010).
26. M. Ø. Pedersen, R. Jensen, D. S. Pedersen, A. D. Skjolding, C. Hempel, L. Maretty, M. Penkowa, Metallothionein-I+II in neuroprotection. *Biofactors.* **35**, 315–325 (2009).
27. S. Pluchino, L. Peruzzotti-Jametti, Interleukin-4 induced 1 (IL4I1) promotes central nervous system remyelination. *Brain.* **139**, 3052–3054 (2016).
28. M. Martinez-Moreno, T. M. O'Shea, J. P. Zepecki, A. Olaru, J. K. Ness, R. Langer, N. Tapinos, Regulation of Peripheral Myelination through Transcriptional Buffering of Egr2 by an Antisense Long Non-coding RNA. *Cell Rep.* **20**, 1950–1963 (2017).
29. M. Samardzija, H. Wariwoda, C. Imsand, P. Huber, S. R. Heynen, A. Gubler, C. Grimm, Activation of survival pathways in the degenerating retina of rd10 mice. *Exp. Eye Res.* **99**, 17–26 (2012).
30. C.-B. Hu, B.-D. Sui, B.-Y. Wang, G. Li, C.-H. Hu, C.-X. Zheng, F.-Y. Du, C.-H. Zhu, H.-B. Li, Y. Feng, Y. Jin, X.-R. Yu, NDRG2 suppression as a molecular hallmark of photoreceptor-specific cell death in the mouse retina. *Cell Death Discov.* **4**, 32 (2018).
31. S. Mitra, P. Sharma, S. Kaur, M. A. Khursheed, S. Gupta, M. Chaudhary, A. J. Kurup, R. Ramachandran, Dual regulation of lin28a by Myc is necessary during zebrafish retina regeneration. *J. Cell Biol.* **218**, 489–507 (2019).
32. T. J. Yuen, K. R. Johnson, V. E. Miron, C. Zhao, J. Quandt, M. C. Harrisingh, M. Swire, A. Williams, H. F. McFarland, R. J. M. Franklin, C. Ffrench-Constant, Identification of endothelin 2 as an inflammatory factor that promotes central nervous system remyelination. *Brain.* **136**, 1035–1047 (2013).
33. D. K. Ma, M.-H. Jang, J. U. Guo, Y. Kitabatake, M. Chang, N. Pow-anpongkul, R. A. Flavell, B. Lu, G. Ming, H. Song, Neuronal Activity-Induced Gadd45b Promotes Epigenetic DNA Demethylation and Adult Neurogenesis. *Science.* **323**, 1074–1077 (2009).
34. L. Li, G. Du, D. Wang, J. Zhou, G. Jiang, H. Jiang, Overexpression of Heme Oxygenase-1 in Mesenchymal Stem Cells Augments Their Protection on Retinal Cells In Vitro and Attenuates Retinal Ischemia/Reperfusion Injury In Vivo against Oxidative Stress. *Stem Cells Int.* **2017**, 4985323 (2017).
35. Y. Ito, H. Tanaka, H. Hara, The potential roles of metallothionein as a therapeutic target for cerebral ischemia and retinal diseases. *Curr Pharm Biotechnol.* **14**, 400–407 (2013).
36. Y. S. Lee, A. Amadi-Obi, C.-R. Yu, C. E. Egwuagu, Retinal cells suppress intraocular inflammation (uveitis) through production of interleukin-27 and interleukin-10. *Immunology.* **132**, 492–502 (2011).
37. J. Marquet, F. Lasoudris, C. Cousin, M.-L. Puiiffe, N. Martin-Garcia, V. Baud, F. Chereau, J.-P. Farcet, V. Molinier-Frenkel, F. Castellano, Dichotomy between factors inducing the immunosuppressive enzyme IL-4-induced gene 1 (IL4I1) in B lymphocytes and mononuclear phagocytes. *Eur. J. Immunol.* **40**, 2557–2568 (2010).
38. J.-W. Kwon, H.-K. Kwon, H.-J. Shin, Y.-M. Choi, M. A. Anwar, S. Choi, Activating transcription factor 3 represses inflammatory responses by binding to the p65 subunit of NF-κB. *Sci Rep.* **5**, 14470 (2015).

39. N. Kfoury, G. Kapatos, Identification of neuronal target genes for CCAAT/Enhancer Binding Proteins. *Mol Cell Neurosci.* **40**, 313–327 (2009).
40. A. Artz, S. Butz, D. Vestweber, GDF-15 inhibits integrin activation and mouse neutrophil recruitment through the ALK-5/TGF- β RII heterodimer. *Blood.* **128**, 529–541 (2016).
41. B. Schaljo, F. Kratochvill, N. Gratz, I. Sadzak, I. Sauer, M. Hammer, C. Vogl, B. Strobl, M. Müller, P. J. Blackshear, V. Poli, R. Lang, P. J. Murray, P. Kovarik, Tristetraprolin is required for full anti-inflammatory response of murine macrophages to IL-10. *J. Immunol.* **183**, 1197–1206 (2009).
42. M. J. Alcaraz, P. Fernández, M. I. Guillén, Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. *Curr. Pharm. Des.* **9**, 2541–2551 (2003).
43. N. Ipseiz, S. Uderhardt, C. Scholtyssek, M. Steffen, G. Schabbauer, A. Bozec, G. Schett, G. Krönke, The nuclear receptor Nr4a1 mediates anti-inflammatory effects of apoptotic cells. *J. Immunol.* **192**, 4852–4858 (2014).
44. L. Kowalczyk, A. Matet, M. Dor, N. Bararpour, A. Daruich, A. Dirani, F. Behar-Cohen, A. Thomas, N. Turck, Proteome and Metabolome of Subretinal Fluid in Central Serous Chorioretinopathy and Rhegmatogenous Retinal Detachment: A Pilot Case Study. *Transl Vis Sci Technol.* **7**, 3 (2018).
45. J.-C. Quintyn, G. Brasseur, Subretinal fluid in primary rhegmatogenous retinal detachment: physiopathology and composition. *Surv Ophthalmol.* **49**, 96–108 (2004).
46. D. Mitry, M. A. Awan, S. Borooh, A. Syrogiannis, C. Lim-Fat, H. Campbell, A. F. Wright, B. W. Fleck, D. G. Charteris, D. Yorston, J. Singh, Long-term visual acuity and the duration of macular detachment: findings from a prospective population-based study. *Br J Ophthalmol.* **97**, 149–152 (2013).
47. Z. Liu, J. Liu, S. Wang, S. Liu, Y. Zhao, Neuronal uptake of serum albumin is associated with neuron damage during the development of epilepsy. *Exp Ther Med.* **12**, 695–701 (2016).
48. L. V. Brylev, M. N. Zakharova, I. A. Zavalishin, N. V. Gulyaeva, Disruption of blood-brain barrier in amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Neurochem. J.* **6**, 64–70 (2012).
49. S. Garbuzova-Davis, P. R. Sanberg, Blood-CNS Barrier Impairment in ALS patients versus an animal model. *Front Cell Neurosci.* **8** (2014), doi:10.3389/fncel.2014.00021.
50. E.-L. Eskelinen, Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol. Aspects Med.* **27**, 495–502 (2006).
51. C.-Y. Law, C.-W. Siu, K. Fan, W.-H. Lai, K.-W. Au, Y.-M. Lau, L.-Y. Wong, J. C. Y. Ho, Y.-K. Lee, H.-F. Tse, K.-M. Ng, Lysosomal membrane permeabilization is involved in oxidative stress-induced apoptotic cell death in LAMP2-deficient iPSCs-derived cerebral cortical neurons. *Biochem Biophys Res.* **5**, 335–345 (2016).
52. T. Li, S. Yang, X. She, Q. Yan, P. Zhang, H. Zhu, F. Wang, X. Luo, X. Sun, Modulation of α -adrenoceptor signalling protects photoreceptors after retinal detachment by inhibiting oxidative stress and inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **176**, 801–813 (2019).
53. S. G. Joe, Y. J. Kim, J. B. Chae, S. J. Yang, J. Y. Lee, J.-G. Kim, Y. H. Yoon, Structural Recovery of the Detached Macula after Retinal Detachment Repair as Assessed by Optical Coherence Tomography. *Korean Journal of Ophthalmology.* **27**, 178 (2013).
54. J. M. Gaspar, A. Martins, R. Cruz, C. M. P. Rodrigues, A. F. Ambrósio, A. R. Santiago, Tauroursodeoxycholic acid protects retinal neural cells from cell death induced by prolonged exposure to elevated glucose. *Neuroscience.* **253**, 380–388 (2013).
55. Y. Tao, M. He, Q. Yang, Z. Ma, Y. Qu, W. Chen, G. Peng, D. Teng, Systemic taurine treatment provides neuroprotection against retinal photoreceptor degeneration and visual function impairments. *Drug Des Devel Ther.* **13**, 2689–2702 (2019).
56. B. L. Copple, T. Li, Pharmacology of bile acid receptors: Evolution of bile acids from simple detergents to complex signaling molecules. *Pharmacol. Res.* **104**, 9–21 (2016).
57. E. Beli, Y. Yan, L. Moldovan, C. P. Vieira, R. Gao, Y. Duan, R. Prasad, A. Bhatwadekar, F. A. White, S. D. Townsend, L. Chan, C. N. Ryan, D. Morton, E. G. Moldovan, F.-I. Chu, G. Y. Oudit, H. Derendorf, L. Adorini, X. X. Wang, C. Evans-Molina, R. G. Mirmira, M. E. Boulton, M. C. Yoder, Q. Li, M. Levi, J. V. Busik, M. B. Grant, Restructuring of the Gut Microbiome by Intermittent Fasting Prevents Retinopathy and Prolongs Survival in db/db Mice. *Diabetes.* **67**, 1867–1879 (2018).
58. N. Himori, K. Maruyama, K. Yamamoto, M. Yasuda, M. Ryu, K. Omodaka, Y. Shiga, Y. Tanaka, T. Nakazawa, Critical neuroprotective roles of heme oxygenase-1 induction against axonal injury-induced retinal ganglion cell death. *J. Neurosci. Res.* **92**, 1134–1142 (2014).

59. J. Fan, G. Xu, T. Jiang, Y. Qin, Pharmacologic induction of heme oxygenase-1 plays a protective role in diabetic retinopathy in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 6541–6556 (2012).
60. M. Gey, R. Wanner, C. Schilling, M. T. Pedro, D. Sinske, B. Knöll, Atf3 mutant mice show reduced axon regeneration and impaired regeneration-associated gene induction after peripheral nerve injury. *Open Biol.* **6** (2016), doi:10.1098/rsob.160091.
61. D. Ye, Y. Shi, Y. Xu, J. Huang, PACAP Attenuates Optic Nerve Crush-Induced Retinal Ganglion Cell Apoptosis Via Activation of the CREB-Bcl-2 Pathway. *J. Mol. Neurosci.* **68**, 475–484 (2019).
62. A. N. Bramall, M. J. Szego, L. R. Pacione, I. Chang, E. Diez, P. D’Orleans-Juste, D. J. Stewart, W. W. Hauswirth, M. Yanagisawa, R. R. McInnes, Endothelin-2-mediated protection of mutant photoreceptors in inherited photoreceptor degeneration. *PLoS ONE.* **8**, e58023 (2013).
63. B. M. Braunger, A. Ohlmann, M. Koch, N. Tanimoto, C. Volz, Y. Yang, M. R. Bösl, A. Cvekl, H. Jäggle, M. W. Seeliger, E. R. Tamm, Constitutive overexpression of Norrin activates Wnt/ β -catenin and endothelin-2 signaling to protect photoreceptors from light damage. *Neurobiol. Dis.* **50**, 1–12 (2013).
64. J. Lakowski, A. Gonzalez-Cordero, E. L. West, Y.-T. Han, E. Welby, A. Naeem, S. J. I. Blackford, J. W. B. Bainbridge, R. A. Pearson, R. R. Ali, J. C. Sowden, Transplantation of Photoreceptor Precursors Isolated via a Cell Surface Biomarker Panel From Embryonic Stem Cell-Derived Self-Forming Retina. *Stem Cells.* **33**, 2469–2482 (2015).
65. M. Yasuda, Y. Tanaka, M. Ryu, S. Tsuda, T. Nakazawa, RNA sequence reveals mouse retinal transcriptome changes early after axonal injury. *PLoS ONE.* **9**, e93258 (2014).
66. A. Amadi-Obi, C.-R. Yu, I. Dambuza, S.-H. Kim, B. Marrero, C. E. Egwuagu, Interleukin 27 induces the expression of complement factor H (CFH) in the retina. *PLoS ONE.* **7**, e45801 (2012).

Acknowledgments

Funding: Authors acknowledge support from the Abraham J and Phyllis Katz Foundation, USA; Fondation de l’avenir, France; Association Française des Amblyopes Unilatéraux, France; Prix Retina2017, Novartis, Switzerland, NIH R01EY028859 and VA I01RX002806, USA

Author contributions: A.D: conducted the clinical study, performed surgeries and experiments, acquired and analyzed data, and wrote the manuscript. T.J: conducted experiments and acquired data. H.H: measured bile acids in samples by mass spectrometry. M.Z: acquired and analyzed data. J.Y: conducted cone culture experiences, acquired and analyzed data. L.P: conducted cone culture experiences, acquired and analyzed data. M.-C.N: conducted animal experiments. K.D: conducted animal experiments. MB: performed RNA-sequencing. M.B: conducted animal experiments. L.K: acquired data and acted as human samples biobank manager. A.T: analyzed data. J.H.B: acquired and analyzed data. E.P. designed and conducted experiments, acquired and analyzed data, and wrote the manuscript. F.B.-C. designed research study, analyzed data, and wrote the manuscript.

Competing interests: Authors have no commercial interests in the subject of the manuscript or in entities discussed in the manuscript.

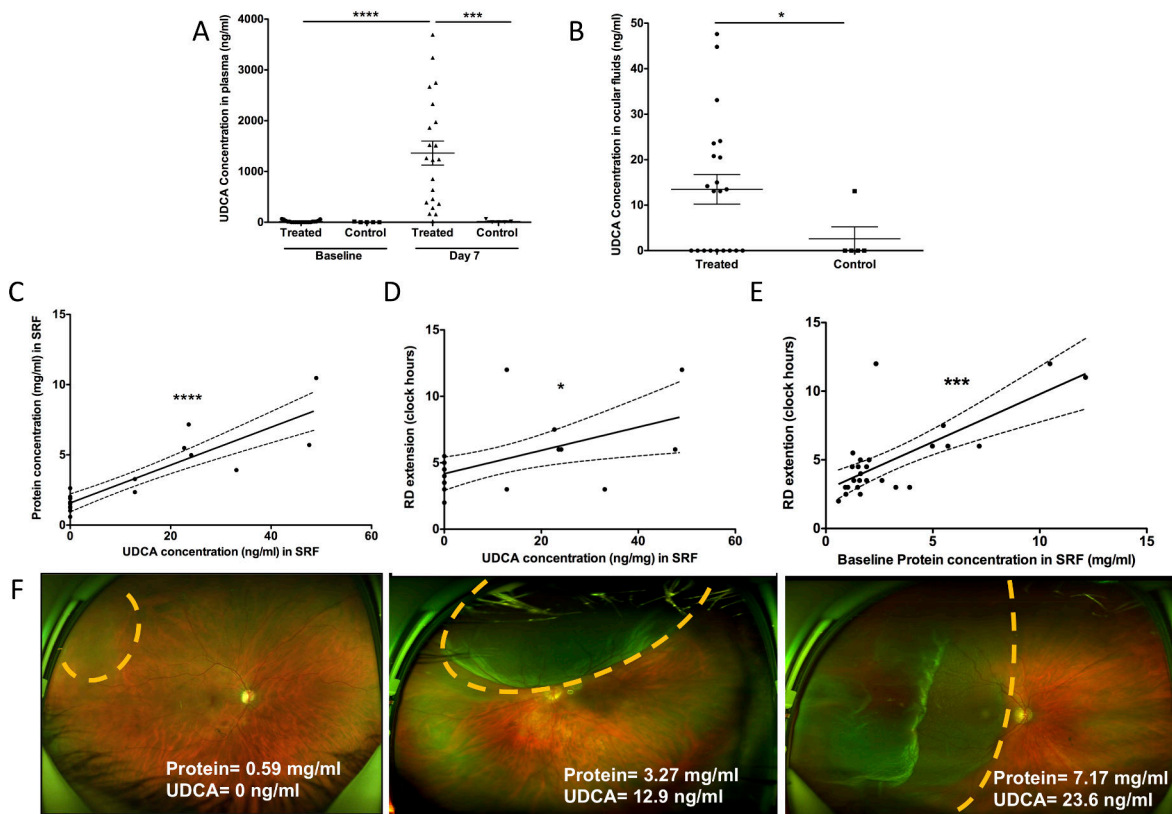


Fig 1: UDCA concentration in plasma and ocular fluid according to blood retinal barrier rupture in patients with retinal detachment. (A) UDCA concentration in plasma at baseline and at 7 days in treated patients (n=21) and controls (n=5). UDCA concentration in plasma did not differ between groups at baseline (p= 0.1, Mann-Whitney test) and increased significantly in treated patients at 7 days (****p<0.0001, Mann-Whitney test). UDCA concentration in plasma at 7 days was significantly higher in treated patients compared with control (***p=0.0009, Mann-Whitney test). (B) UDCA concentration in ocular fluids was significantly higher in treated patients compared with control patients (p= 0.047, Mann-Whitney test). (C) UDCA concentration in subretinal fluid (SRF) was correlated with protein concentration in SRF (***p<0.0001; r=0.8, Spearman correlation) (D) UDCA concentration in SRF was correlated with extension of retinal detachment (RD) in clock hours at baseline (*p=0.013, r=0.5, Spearman correlation). (E) Baseline protein concentration in SRF was correlated with the extension of RD in clock hours at baseline (p=0.0002, r=0.7, Spearman correlation). (F) Clinical examples showing the correlation between the extension of RD (dotted line), the protein concentration in SRF and UDCA concentration in SRF

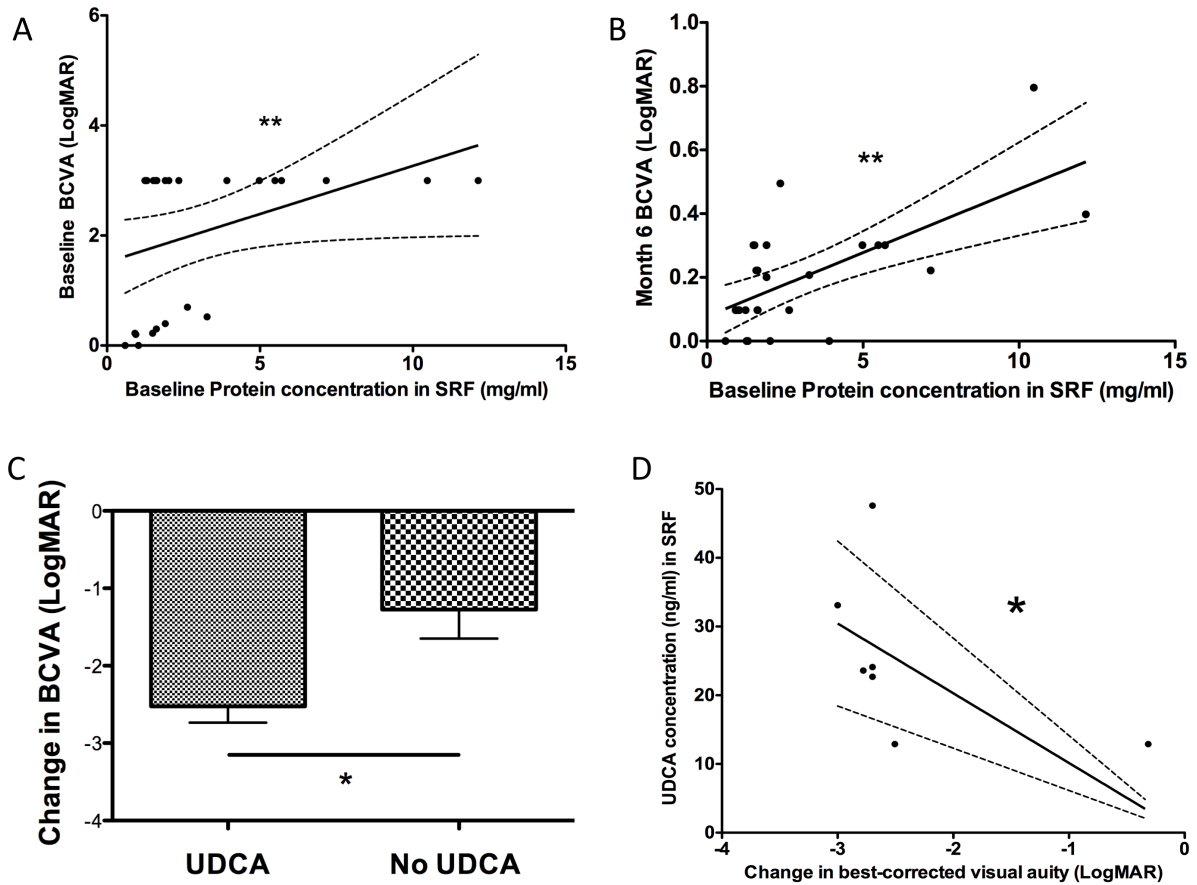


Fig 2. Protein and UDCA concentrations in ocular fluids and visual recovery after surgery for retinal detachment (RD)

(A) Baseline protein concentration in subretinal fluid (SRF) was correlated with lower best-corrected visual acuity (BCVA) at baseline (** $p=0.0004$, $r=0.5$, Spearman correlation). (B) Baseline protein concentration in SRF was correlated with lower visual acuity recovery 6 months after RD surgery (** $p=0.0001$, $r=0.6$, Spearman correlation). (C) Improvement in BCVA at 6 months was significantly higher in patients with presence of UDCA in SRF or vitreous compared with those without UDCA in ocular media ($p=0.035$, Mann-Whitney test). (D) Higher UDCA concentrations in SRF were correlated with higher improvement in BCVA at 6 months ($p=0.04$, $r=0.6$, Spearman correlation)

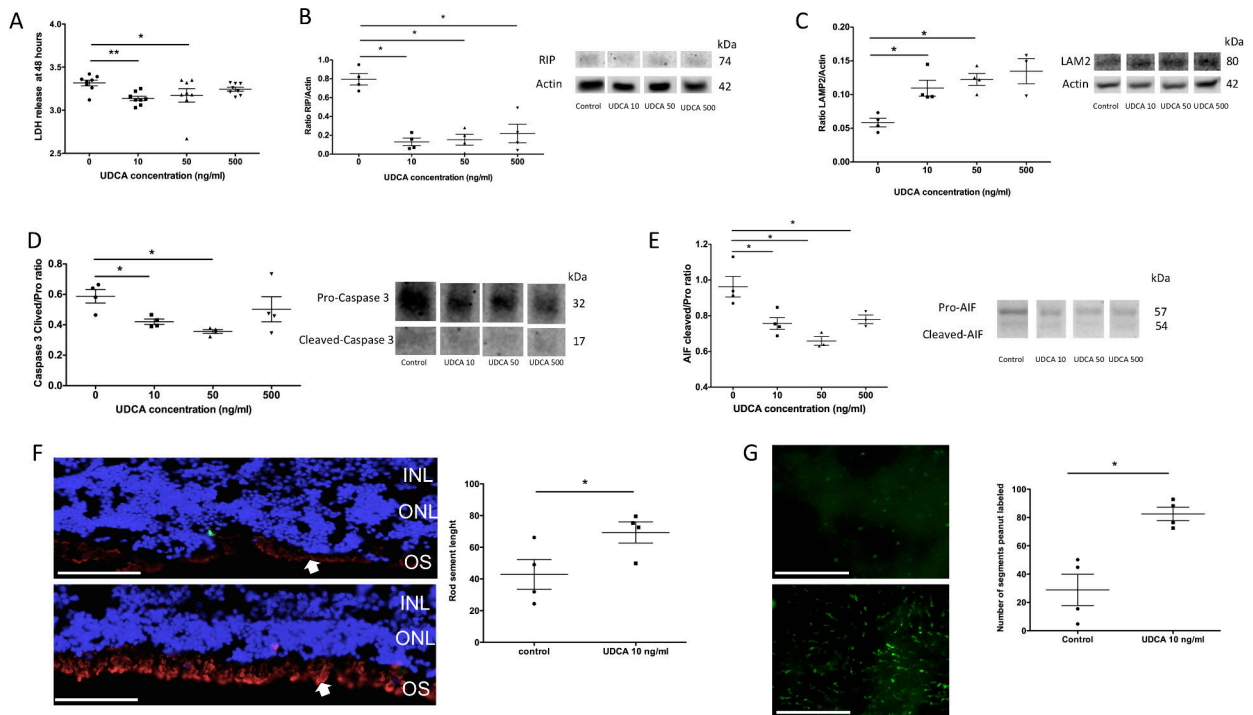


Fig. 3. UDCA at 10 and 50 ng/ml protects from cell death and at 10 ng/ml promotes photoreceptors preservation in rat retinal explants at 48 hours. (A) Lactate dehydrogenase (LDH) release was significantly lower in culture medium from retinas treated with UDCA at 10 ng/ml and 50 ng/ml compared to control (**p=0.002 and *p=0.046 respectively, Mann Whitney test). (B-E) Western blotting and quantitative analysis were performed for receptor-interacting protein (RIP) kinase, Caspase 3, apoptosis-inducing factor (AIF) and lysosomal-associated membrane protein (LAMP) 2. (B) RIP kinase reported on actin was significantly reduced in retinas treated by UDCA at 10, 50 and 500 ng/ml compared with control retinas (*p=0.029, Mann Whitney test). (C) LAMP2 reported on actin was significantly higher in retinas treated by UDCA at 10 and 50 ng/ml compared with control retinas (*p=0.029, Mann Whitney test). (D) The cleaved form of Caspase 3 reported on full-form Caspase 3 was significantly reduced in retinas treated by UDCA at 10 (*p=0.028, Mann Whitney test) and 50 ng/ml (*p=0.014, Mann Whitney test). (E) The cleaved form of AIF reported on the full-form was significantly lower in retinas treated by UDCA at 10, 50 and 500 ng/ml (*p=0.029, Mann Whitney test) compared with control retinas. (F) Immunostaining for Rho4D2 (red) in sections of retina explants. Control (top left) and treated explants by UDCA at 10ng/ml (bottom left). Scale: 50µm. Rod segments length was significantly higher in treated retinas compared with control retinas (*p= 0.029, Mann Whitney test) (right). (G) Immunostaining for peanut agglutinin on flat mounted retina explants. Control (top left) and treated explants by UDCA at 10ng/ml (bottom left). Scale: 100µm. The number of cone segments peanut agglutinin-labeled (green) on flat-mounted retinas was significantly higher in retinas treated compared to control (*p=0.029, Mann Whitney test) (right).

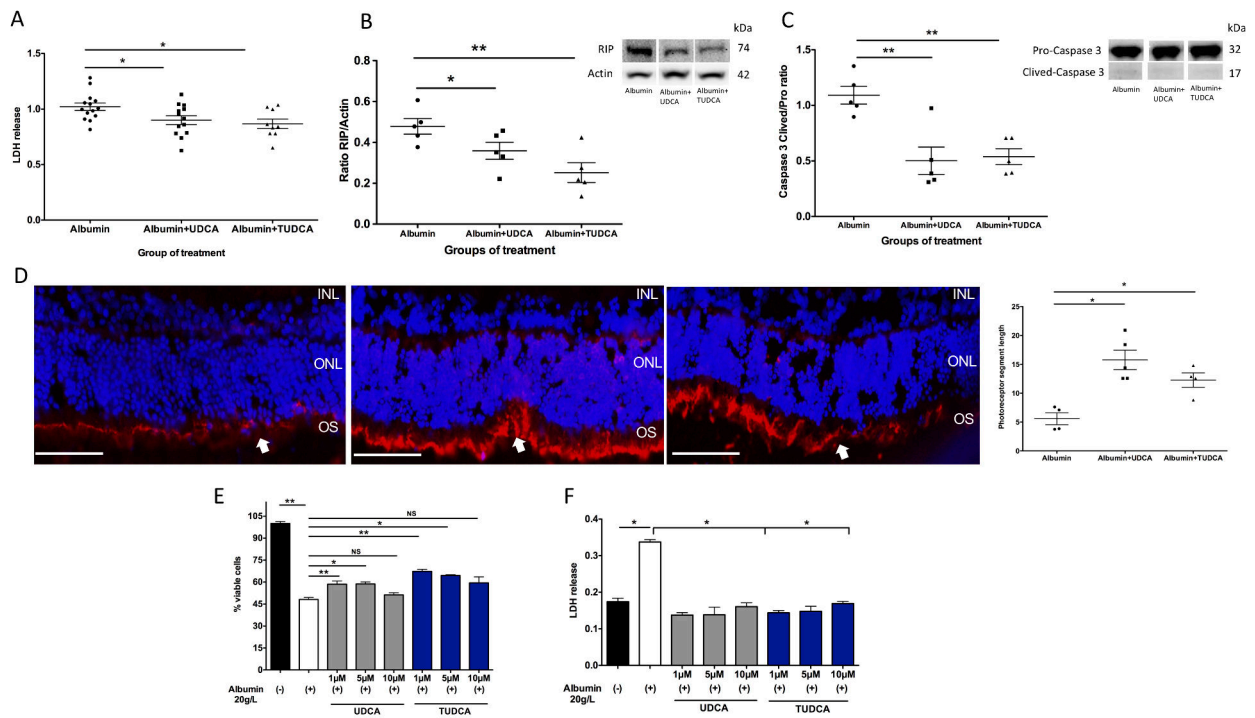


Fig. 4. UDCA and TUDCA protect from albumin induced cell death *ex vivo* and *in vitro*. (A,D) Rat retina explants were treated by albumin alone, albumin and UDCA at 10 ng/ml or albumin and TUDCA at 10 ng/ml and cultured during 6 hours. (A) Lactate dehydrogenase (LDH) release was significantly lower in culture medium from retinas treated by UDCA (*p=0.04, Mann Whitney test) and TUDCA (*p=0.02 Mann-Whitney test) compared to those from control retinas (albumin alone). (B) Western blotting and quantitative analysis for receptor-interacting protein (RIP) kinase. RIP/ Actin ratio was significantly lower in retinas treated by UDCA (*p=0.02, Mann Whitney test) and TUDCA (**p= 0.008, Mann-Whitney test) compared to controls. (C) Western blotting and quantitative analysis for Caspase 3. Cleaved-caspase 3/ Pro-caspase 3 ratio was lower in retinas treated by UDCA (**p=0.008, Mann Whitney test) and TUDCA (**p=0.004, Mann Whitney test) compared with controls. (D) Immunostaining for Rho4D2 (red) in sections of retina explants treated by albumin, albumin and UDCA at 10 ng/ml or albumin and TUDCA at 10 ng/ml (from left to right). Scale: 50µm. Rod segments length was significantly higher in UDCA and TUDCA treated retinas compared with untreated retinas (*p= 0.01 and 0.03, respectively, Mann Whitney test) (right). (E-F) Humans cone cells (WERI-Rb-1) were treated by albumin at 20 mg/ml and culture during 24 hours. Treatment by UDCA and TUDCA at increasing concentrations (1, 5 and 10 µM) was performed 1 hour before albumin stress. (E) The % of mitochondrial activity decreases significantly with albumin stress compared to control (**p=0.001, Mann-Whitney test). The percentage of mitochondrial activity was significantly higher when cones were previously treated by 1 and 5 µM of UDCA (**p= 0.004 and *p=0.01 respectively, Mann-Whitney test) or TUDCA (**p=0.001 and *p=0.01, Mann-Whitney test) compared to albumin alone. (F) Lactate dehydrogenase (LDH) release was significantly lower when cones were previously treated by 1, 5 and 10 µM of UDCA (*p= 0.03 for all concentrations, Mann-Whitney test) or TUDCA (*p=0.03 for all concentrations, Mann-Whitney test).

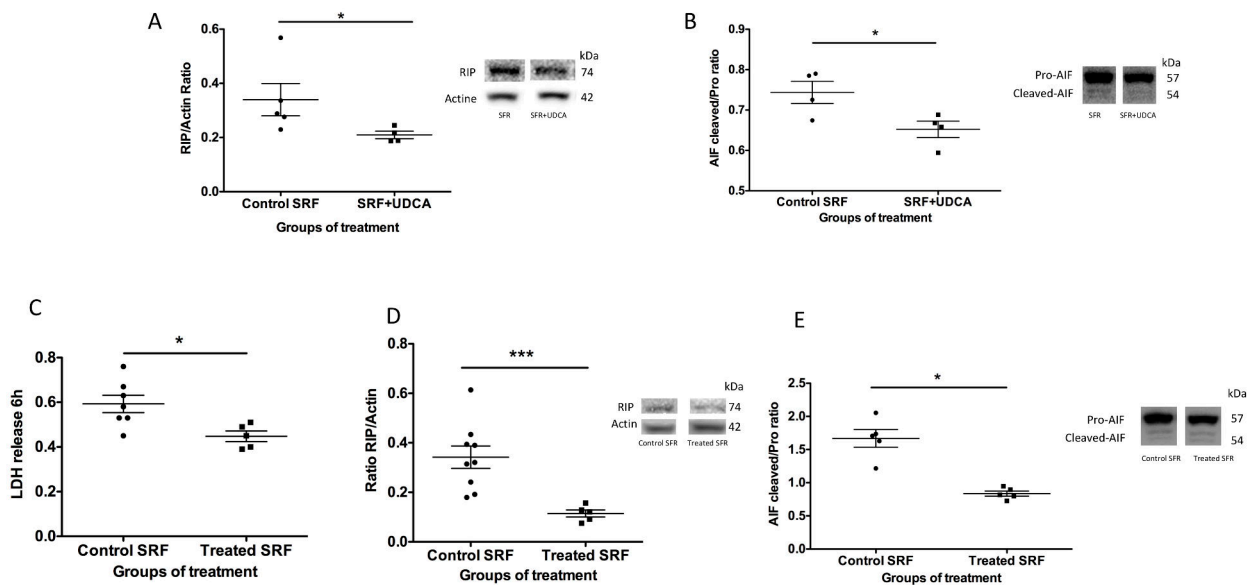


Fig. 5. UDCA protects from cell death in subretinal fluid (SRF)-exposed rat retina explants during 6 hours. (A,B) SRF of control patients without and with the addition of UDCA at 10 ng/ml. (A) Western blotting and quantitative analysis for receptor-interacting protein (RIP) kinase. RIP/Actin ratio was significantly lower in retinas treated by SRF + UDCA (* $p=0.03$, Mann Whitney test) compared to control SRF. (B). Western blotting and quantitative analysis for apoptosis-inducing factor (AIF). The cleaved form of AIF reported on the full-form was significantly lower in retinas treated by SRF + UDCA (* $p=0.03$, Mann Whitney test) compared to the control SRF. (C-E) SRF of oral UDCA treated patients were compared with SRF of control patients. (C) Lactate dehydrogenase (LDH) release was significantly lower in culture medium from retinas treated by SRF of oral UDCA treated patients compared to retinas treated by SRF of control patients (* $p=0.02$, Mann Whitney test). (D) Western blotting and quantitative analysis for RIP kinase. RIP/Actin ratio was significantly lower in retinas treated by SRF from UDCA treated patients compared to retinas treated by SRF from control patients (*** $p=0.001$, Mann Whitney test). (E) Western blotting and quantitative analysis for AIF. The cleaved form of AIF reported on the full-form was significantly lower in retinas treated by SRF from UDCA treated patients compared to retinas treated by SRF from control patients (* $p=0.04$, Mann Whitney test).

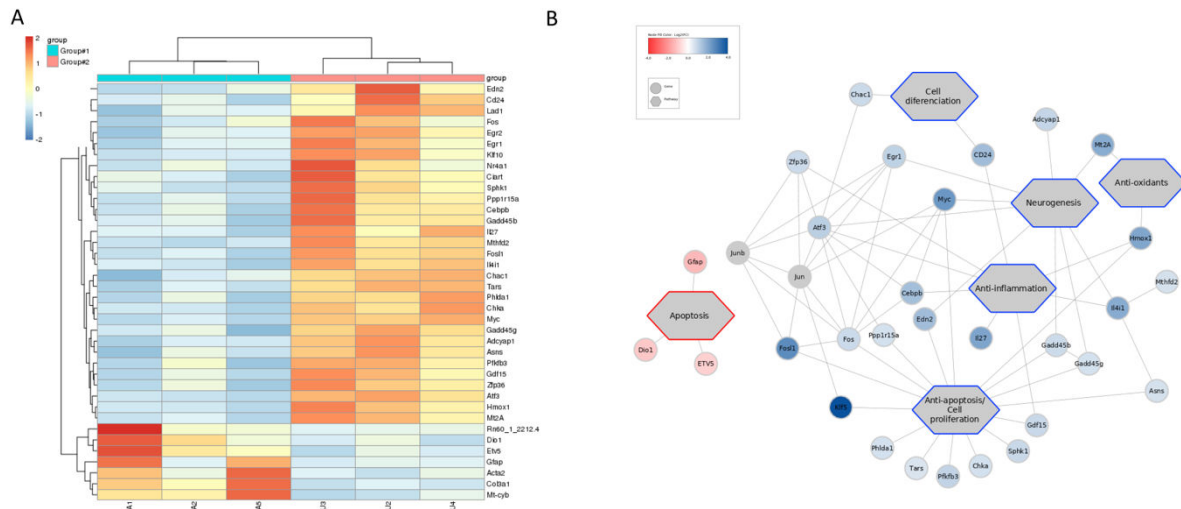


Fig. 6. RNA-seq analysis of rat retinal explants exposed to albumin alone (A, group 1) or albumin plus UDCA (U, group 2) during 6 hours. (A) Heatmap showed 31 genes up-regulated and 7 genes down-regulated by UDCA plus albumin compared to albumin alone (B) Network of main genes up-regulated (bleu) and down-regulated by UDCA and involved pathways.

Supplementary Materials

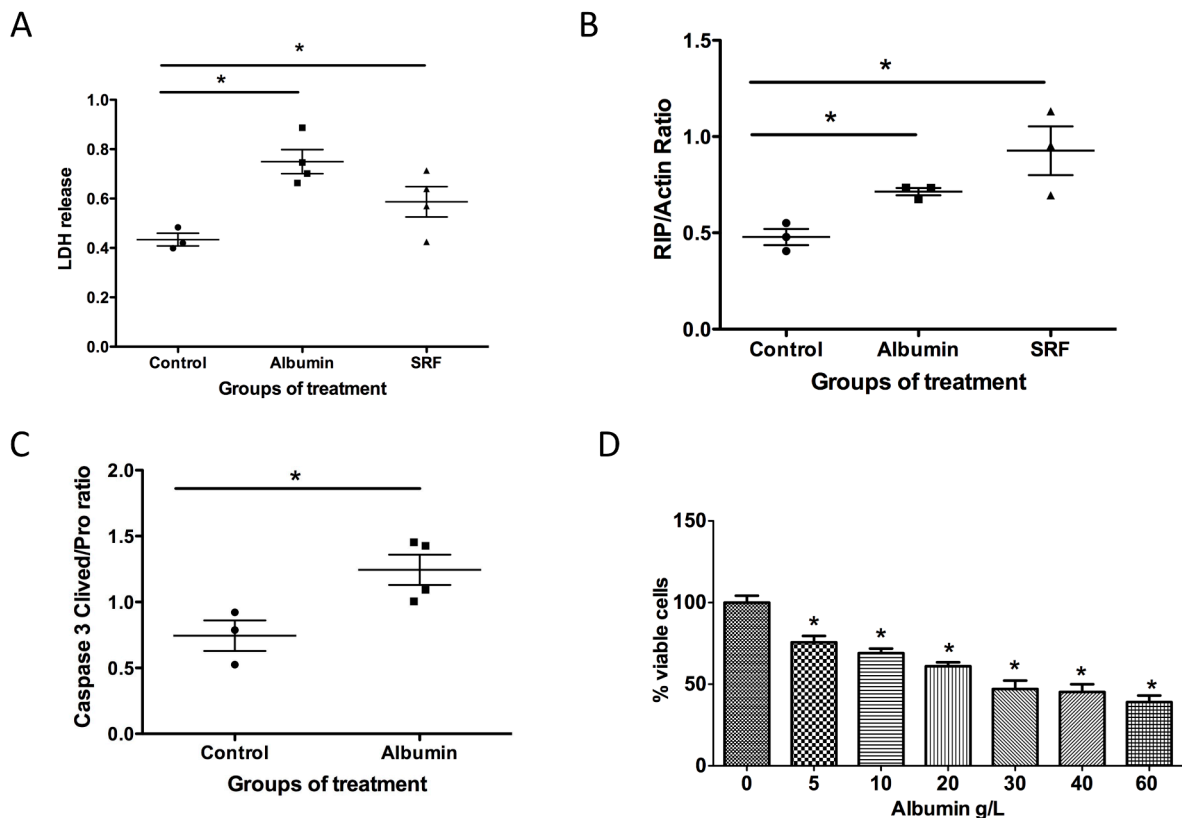


Fig. S1. Albumin and subretinal fluid (SRF) induced cell death (A-C) Rat retinal explant were exposed to albumin (12mg/ml), SRF or medium (control) during 6 hours (A). Lactate dehydrogenase (LDH) release was significantly lower in culture medium from control retinas compared to albumin and subretinal fluid (SRF) treated retinas (B,C) Western blotting and quantitative analysis were performed for receptor-interacting protein (RIP) and Caspase 3. (B) RIP kinase reported on actin was significantly reduced in control retinas compared to albumin and SRF treated retinas (* $p < 0.05$, Mann Whitney test). (C) The cleaved form of Caspase 3 reported on full-form Caspase 3 was significantly reduced in control retinas compared to albumin (* $p < 0.05$, Mann Whitney test). SRF did not induced the cleaved-form of Caspase 3. (D) Humans cones (WERI-Rb-1 cell line) were treated by albumin (from 2.5 to 40 g/L) during 24 hours and mitochondrial activity was measured. Albumin concentrations higher than 5g/L significantly decrease mitochondrial activity compared to the control (* $p < 0.05$). A concentration of albumin at 20 g/L induced a mean of 40% of decrease of mitochondrial activity.

Supplementary Table 1: Reported side-effects in Ursodeoxycholic acid treated patients and controls during 6 months follow-up

Side effects	Day 1	Day 7	Month 1	Month 2	Month 3	Month 4	Month6	Total*
Nausea	TG=0 CG=0	TG=1 CG=0	TG=0 CG=0	TG=0 CG=0	TG=0 CG=0	TG=0 CG=0	TG=0 CG=0	TG=1 CG=0
Epigastric pain	TG=0 CG=0	TG=3 CG=0	TG=1 CG=0	TG=1 CG=0	TG=0 CG=0	TG=2 CG=0	TG=0 CG=0	TG=7 CG=0
Flatulence	TG=0 CG=0	TG=7 CG=1	TG=2 CG=0	TG=2 CG=0	TG=1 CG=0	TG=2 CG=0	TG=0 CG=0	TG=14 CG=1
Diarrhea	TG=1 CG=0	TG=0 CG=0	TG=3 CG=0	TG=1 CG=0	TG=1 CG=0	TG=1 CG=0	TG=1 CG=0	TG=8 CG=0
Constipation	TG=0 CG=0	TG=3 CG=0	TG=6 CG=0	TG=2 CG=0	TG=0 CG=0	TG=1 CG=0	TG=0 CG=0	TG=12 CG=0
Unpleasant taste	TG=0 CG=0	TG=3 CG=0	TG=3 CG=0	TG=2 CG=0	TG=2 CG=0	TG=1 CG=0	TG=0 CG=0	TG=11 CG=0
Heavy digestion	TG=0 CG=0	TG=2 CG=0	TG=0 CG=0	TG=0 CG=0	TG=0 CG=0	TG=0 CG=0	TG=0 CG=0	TG=2 CG=0
Tingling	TG=0 CG=0	TG=2 CG=0	TG=2 CG=1	TG=2 CG=0	TG=1 CG=0	TG=0 CG=0	TG=1 CG=0	TG=8 CG=1
Trouble vision fellow eye	TG=0 CG=1	TG=5 CG=1	TG=1 CG=0	TG=2 CG=0	TG=0 CG=0	TG=0 CG=0	TG=0 CG=0	TG=8 CG=2
Fatigue	TG=0 CG=0	TG=0 CG=0	TG=2 CG=0	TG=0 CG=0	TG=1 CG=0	TG=0 CG=0	TG=0 CG=0	TG=3 CG=0
Headache	TG=1 CG=1	TG=4 CG=2	TG=4 CG=2	TG=2 CG=0	TG=0 CG=0	TG=2 CG=0	TG=0 CG=0	TG=13 CG=5
Discomfort	TG=0 CG=0	TG=1 CG=0	TG=0 CG=0	TG=0 CG=0	TG=0 CG=0	TG=0 CG=0	TG=0 CG=0	TG=1 CG=0
Skin rash	TG=0 CG=0	TG=0 CG=0	TG=0 CG=0	TG=1 CG=0	TG=0 CG=0	TG=0 CG=0	TG=0 CG=0	TG=1 CG=0

TG=treated group (n=21 patients); CG=control group (n=5 patients); * p=0.01 (Fisher's exact test): side effects were more frequently reported in treated patients than in control group, but there was no significantly difference in the frequency of which each side effects was reported in both groups.

Supplementary Table 2: Patient-reported drug adverse effects questionnaire

Did you have stomach pain?	YES	NO
Did you have diarrhea?	YES	NO
Have you had any episodes of constipation?	YES	NO
Have you felt heavy digestion?	YES	NO
Did you emit excessive digestive gas (flatulencies)?	YES	NO
Have you had a rash (pimples)?	YES	NO
Did you feel unwell?	YES	NO
Did you have difficulty breathing?	YES	NO
Did you have an unpleasant taste when taking the medicine or right after?	YES	NO
Have you had fever or chills?	YES	NO
Did you have a headache?	YES	NO
Did you have an episode of blurred vision (in the unoperated eye)	YES	NO
Did you feel tingling in your arms or legs?	YES	NO

Supplementary Data File 1: GSEA Hallmark genes set. Albumin vs Albumin and UDCA on rats retinal explants (next page)

Pval: p value, padj: p adjusted, ES: enrichment score, NES: normalized enrichment score

pathway	pval	padj	ES	NES	nMoreExtreme	size
HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	0.001443001	0.006336333	0.782773661	2.882337169	0	181
HALLMARK_HYPOXIA	0.001457726	0.006336333	0.654599465	2.390633122	0	167
HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	0.001647446	0.006336333	0.731238843	2.325397113	0	65
HALLMARK_P53_PATHWAY	0.001466276	0.006336333	0.608547026	2.226792578	0	172
HALLMARK_UV_RESPONSE_UP	0.001517451	0.006336333	0.62011042	2.216369	0	144
HALLMARK_APOPTOSIS	0.001515152	0.006336333	0.609194862	2.165573866	0	139
HALLMARK_UNFOLDED_PROTEIN_RESPONSE	0.00154321	0.006336333	0.599793115	2.047178105	0	104
HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE	0.001466276	0.006336333	0.553315395	2.018032949	0	166
HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALING	0.001474926	0.006336333	0.543084295	1.981075448	0	160
HALLMARK_INTERFERON_ALPHA_RESPONSE	0.001597444	0.006336333	0.586256997	1.950599797	0	85
HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE	0.001512859	0.006336333	0.535677037	1.913321502	0	146
HALLMARK_ALLOGRAFT_REJECTION	0.001506024	0.006336333	0.537954905	1.897846068	0	130
HALLMARK_MTORC1_SIGNALING	0.001432665	0.006336333	0.472513318	1.752402668	0	189
HALLMARK_COMPLEMENT	0.003012048	0.010757315	0.470371394	1.687634349	1	148
HALLMARK_CHOLESTEROL_HOMEOSTASIS	0.003257329	0.010857763	0.557617225	1.810033848	1	71
HALLMARK_ESTROGEN_RESPONSE_EARLY	0.007331378	0.022910557	0.435718822	1.589138758	4	166
HALLMARK_NOTCH_SIGNALING	0.00968523	0.028485971	-0.576604585	-1.677404284	3	31
HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP	0.01179941	0.032776139	0.433744894	1.571029833	7	150
HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	0.025316456	0.066622252	-0.334530929	-1.337270102	7	167
HALLMARK_XENOBIOTIC_METABOLISM	0.034954407	0.087386018	0.390637033	1.393106586	22	142
HALLMARK_REACTIVE_OXIGEN_SPECIES_PATHWAY	0.049069374	0.116831843	0.492256041	1.470539212	28	44
HALLMARK_PI3K_AKT_MTOR_SIGNALING	0.077041602	0.175094551	0.38921396	1.311953979	49	94
HALLMARK_TGF_BETA_SIGNALING	0.087328767	0.182748538	0.454192761	1.380156441	50	50
HALLMARK_SPERMATOGENESIS	0.087719298	0.182748538	0.398813436	1.314509852	54	79
HALLMARK_DNA_REPAIR	0.094117647	0.188235294	-0.308507462	-1.206721398	31	136
HALLMARK_MYC_TARGETS_V2	0.098138748	0.188728361	0.429252337	1.332653287	57	56
HALLMARK_HEDGEHOG_SIGNALING	0.108658744	0.201219896	0.475759729	1.34533979	63	31
HALLMARK_KRAS_SIGNALING_DN	0.15279879	0.272854982	0.343845964	1.195076134	100	117
HALLMARK_UV_RESPONSE_DN	0.161387632	0.278254538	0.330798949	1.169808477	106	133

HALLMARK_G2M_CHECKPOINT	0.168621701	0.281036168	0.32316591	1.178639633	114	166
HALLMARK_ADIPOGENESIS	0.189928058	0.303375912	0.312379051	1.149102298	131	175
HALLMARK_E2F_TARGETS	0.194160584	0.303375912	0.311207958	1.139317279	132	171
HALLMARK_ANGIOGENESIS	0.218362283	0.330851944	-0.421788637	-1.209591551	87	28
HALLMARK_WNT_BETA_CATENIN_SIGNALING	0.297723292	0.406836489	0.393863965	1.128743	169	35
HALLMARK_ESTROGEN_RESPONSE_LATE	0.300884956	0.406836489	0.294744767	1.075176775	203	160
HALLMARK_MYOGENESIS	0.301059002	0.406836489	0.298791275	1.067217244	198	146
HALLMARK_FATTY_ACID_METABOLISM	0.278106509	0.406836489	-0.279229994	-1.080819512	93	131
HALLMARK_ANDROGEN_RESPONSE	0.351123596	0.462004731	-0.28418179	-1.039929251	124	93
HALLMARK_APICAL_SURFACE	0.393526405	0.491908007	0.376299921	1.051665212	230	30
HALLMARK_BILE_ACID_METABOLISM	0.390501319	0.491908007	-0.280889152	-1.013096954	147	81
HALLMARK_COAGULATION	0.412698413	0.503290747	0.311283981	1.031612233	259	82
HALLMARK_APICAL_JUNCTION	0.428134557	0.509683996	-0.249841426	-1.006010795	139	169
HALLMARK_MYC_TARGETS_V1	0.47639485	0.541357784	0.263921107	0.980373285	332	193
HALLMARK_PANCREAS_BETA_CELLS	0.468697124	0.541357784	0.365423107	0.964231838	276	23
HALLMARK_GLYCOLYSIS	0.517595308	0.575105898	0.265476862	0.968238114	352	166
HALLMARK_HEME_METABOLISM	0.832095097	0.904451192	0.229702292	0.835685698	559	159
HALLMARK_PEROXISOME	0.964174455	0.998546512	0.206901048	0.695350663	618	88
HALLMARK_MITOTIC_SPINDLE	0.992743106	0.998546512	0.185379527	0.683529301	683	183
HALLMARK_PROTEIN_SECRETION	0.968847352	0.998546512	0.202660747	0.681099906	621	88
HALLMARK_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	0.998546512	0.998546512	0.179301261	0.657532674	686	176

4 Discussion et Perspectives

4.1 Discussion

Au cours de ce travail de thèse, la mise en œuvre d'une stratégie translationnelle a permis d'explorer les mécanismes de mort des photorécepteurs dans des modèles de DR, ainsi que l'effet neuroprotecteur rétinien de deux molécules : la transferrine et l'UDCA.

4.1.1 Le décollement de rétine : de la pathologie chez l'homme aux modèles animaux

Au cours du DR rhéghmatogène, la séparation de la rétine neurosensorielle de l'épithélium pigmentaire sous-jacent perturbe le métabolisme des photorécepteurs (Figure 5) et conduit à leur mort, responsable d'une perte de vision.⁸ Pourtant, dans d'autres formes de DR non rhéghmatogène, la rétine peut rester décollée de l'EPR pendant plusieurs semaines sans affecter significativement la vision. La composition du LSR pourrait être donc un facteur déterminant dans la mort des photorécepteurs. Mais la composition exacte du LSR au cours du DR rhéghmatogène est imparfaitement connue. Nous avons réalisé précédemment une analyse moléculaire protéomique et métabolomique de LSR collecté sur des DR chroniques et avons identifié de possibles voies neurotoxiques.¹⁵⁹ L'origine exacte du LSR au cours du DR n'est pas parfaitement claire et l'hypothèse actuelle est qu'il proviendrait d'un passage de vitré par la déchirure rétinienne. De façon intéressante, nous avons montré que le vitré était moins toxique pour les photorécepteurs que le LSR (Annexe 2), suggérant que le LSR ne contient pas que du vitré et qu'il concentre d'autres substances. Il était donc pertinent de poursuivre l'exploration du contenu moléculaire du LSR et plus spécifiquement de molécules

neurotoxiques pour les photorécepteurs contenues dans le LSR. Nous avons mesuré des taux de fer augmentés dans le LSR de patients atteints de DR qui étaient corrélés à une durée de DR plus prolongée et à une moindre récupération visuelle à un mois post-opératoire. De même, avec la durée du DR, la concentration en protéines dans le LSR augmente¹⁶⁰ et le pronostic visuel se détériore.^{43,44} Nous avons montré qu'une concentration élevée en protéines dans le LSR, était corrélée à une moindre acuité visuelle en pré-opératoire et à 6 mois post-opératoire (Figure 2, Article 3). Nous pouvons donc supposer que le LSR contient plusieurs molécules neurotoxiques, dont la concentration augmente avec la durée du DR et participent aux multiples mécanismes de mort cellulaire impliqués dans le DR.⁸

L'explant rétinien, consistant à la dissection de la rétine neurosensorielle et sa mise en culture, est un modèle *ex vivo* de DR connu pour mimer les caractéristiques pathologiques du DR.¹⁶¹ En traitant des explants de rats par du fer ou de l'albumine nous avons voulu créer des modèles de DR *ex vivo* plus proches de la maladie chez l'homme (Figure 2, Article 2 et Figure 4, Article 3). Avec le même objectif, nous avons également traité les explants rétiniens avec du LSR prélevé chez des patients atteints de DR. Nous avons aussi utilisé un modèle *in vivo* de DR chez le rat et chez la souris.

Le DR constitue une maladie modèle de mort rapide des photorécepteurs. Nous avons observé une augmentation des marqueurs de mort cellulaire par WB, et des changements structuraux au niveau des photorécepteurs par immunomarquage quelques heures après l'induction de modèles *ex vivo* de DR. Dans les modèles de mort induite, par exposition à l'albumine ou au LSR, ces modifications ont été observées après 6 heures (Figures 4 et 5, Article 3), et dans le modèle de mort spontanée, ou celui induit par le fer, à 48 heures (Figure 3, Article 3 et Figure S1, Article 2). En ce qui concerne le modèle *in vivo* de DR chez le rongeur, nous avons constaté des modifications histologiques de la rétine externe 7 jours après l'induction du DR (Figure 4 et 6, Article 2). Ces résultats sont en concordance avec des études précédemment rapportées. Dans

des prélèvements de rétines effectués lors d'une vitrectomie chez des patients présentant un DR primaire ou récurrent, Arroyo JG *et al.*⁷ ont observé des cellules TUNEL-positives dès 24 heures après le début du DR, avec un pic à 48h et une diminution progressive vers le 7^{ème} jour. Dans un modèle expérimental de DR chez le chat, Cook B *et al.*¹⁶² ont montré des cellules TUNEL-positives et PI (iodure de propidium)-positives, particulièrement augmentées les 3 premiers jours du DR, avec une diminution progressive au cours du temps. À 28 jours, il existait encore des cellules TUNEL-positives au niveau de la couche des photorécepteurs. Cela est en concordance avec les observations cliniques. Il a été constaté que la récupération visuelle post opératoire diminue avec la durée du DR, notamment après le troisième jour de soulèvement maculaire.^{43,44}

Une des premières modifications structurales observées lors de la séparation de la rétine neurosensorielle de l'EPR est la diminution de la longueur des segments des photorécepteurs,¹⁶³⁻¹⁶⁵ ce que nous avons pu constater dans nos modèles *ex vivo* (Figures 3 et 4, Article 3) et *in vivo* (Figures 4, 6, et S5 Article 2) de DR. De façon analogue, des altérations structurales au niveau des segments des photorécepteurs, observées en SD-OCT (*spectral-domain optical coherence tomography* ou tomographie par cohérence optique), sont un des principaux facteurs pronostiques dans la récupération visuelle postopératoire chez les patients.^{48,50,51}

Ces modèles expérimentaux de DR reproduisent donc de façon proche la pathologie chez l'homme, ce qui les rend appropriés pour étudier les mécanismes impliqués et les stratégies pharmacothérapeutiques. De plus, le modèle de DR récapitule plusieurs mécanismes de mort, tels que l'apoptose, la nécrose, l'autophagie et l'inflammation,⁸ observés dans plusieurs modèles de dégénérescence rétinienne. Enfin, le DR étant une pathologie nécessitant un traitement chirurgical, nous avons pu accéder aux prélèvements oculaires de vitré et de LSR de

patients, facilitant ainsi la stratégie translationnelle de ce travail, et permettant de rapprocher les conditions expérimentales au plus près des conditions cliniques.

4.1.2 Toxicité du fer et rôle neuroprotecteur de la transferrine dans le décollement de rétine

Nous avons pu constater une augmentation significative du fer dans les liquides oculaires de patients opérés de DR (Figure 1, Article 2). Cette augmentation du fer pourrait résulter d'une combinaison de facteurs. Dans des conditions physiologiques, l'incorporation du fer dans les cellules (Figure 15) est médiée par l'interaction de la transferrine avec son récepteur de surface au niveau de la membrane basale de l'EPR. Le décollement de rétine entraîne une modification des cellules de l'EPR et une rupture de la barrière hémato-rétinienne externe,¹⁶⁵ qui pourrait favoriser l'entrée de fer libre. Cependant, une accumulation de fer a également été mise en évidence dans la DMLA, sans rupture de barrière apparente, ce qui suggère que d'autres mécanismes contribuent à l'augmentation du fer.^{83,122} Chez les rats du Royal College of Surgeons (RCS), un modèle génétique de phagocytose déficiente, l'EPR ne parvient pas à phagocyter les segments externes des photorécepteurs, ce qui entraîne l'accumulation de débris non digérés dans l'espace sous-rétinien, ainsi qu'une accumulation de fer dans les photorécepteurs.⁷⁹ Au cours du DR, la perte du contact entre les photorécepteurs et l'EPR pourrait favoriser cette accumulation de fer intracellulaire, participant à la mort des photorécepteurs. Nous avons montré sur des explants rétiniens que le contact direct avec le fer provoque une nécrose rapide des photorécepteurs (Figure 2, Article 2). La peroxydation par le fer des acides gras polyinsaturés dans les segments externes pourrait constituer un mécanisme nécrotique.¹⁶⁶ De plus, les explants de rétine mis en présence de fer induisent une mort cellulaire apoptotique retardée. Celle-ci pourrait résulter d'une oxydation intracellulaire induite par le fer au cours du cycle de réaction de Fenton/Haber-Weiss (ADN, ARN, lipides et protéines),⁶⁴

comme le suggèrent les cassures de l'ADN (8-HGN) et la peroxydation des lipides (4-HNE) observées (Fig. S4, Article 2).

Le pourcentage de transferrine saturée observé dans les fluides oculaires suggère que les capacités rétinienne de charge en fer sont complètement saturées chez les patients atteints de DR (Figure 1, Article 2). Par conséquent, l'utilisation thérapeutique de la transferrine apparaît comme une stratégie pertinente. Nous avons confirmé que l'apo-transferrine élimine efficacement le fer et protège les photorécepteurs de la mort cellulaire (Figures 3 et 4, Article 2), du stress oxydant et de l'inflammation (Figure S3 et S4, Article 2), dans des modèles animaux de DR, en concordance avec des études rapportées précédemment, dans d'autres modèles de dégénérescence rétinienne.^{81,113,122} En utilisant des souris TG qui expriment la transferrine humaine dans la rétine, ainsi que des modèles traités par la transferrine exogène, nous avons démontré que la transferrine réduisait à la fois la nécrose (diminution de RIP kinase) et l'apoptose (réduction de caspase 8 et caspase 3) induites par le fer (Figures 3 et 4, Article 2). L'effet anti-apoptotique de la transferrine a également été décrit dans les hépatocytes, où il a été montré que la transferrine protège contre la mort cellulaire induite par Fas, en réduisant le clivage BID, en inhibant les activations des caspase 3 et 9, et en régulant positivement Bcl-XL.¹⁶⁷ Le transcriptome rétinien des souris TG comparé aux souris WT après DR a mis en évidence sept groupes principaux de voies régulées par la transferrine: phagocytose, systèmes immunitaires, homéostasie de la rétine, processus neurologiques, remodelage de la matrice extra-cellulaire, mécanismes de mort cellulaire et métabolisme (Figure 5 Article 2). Parmi les nombreuses voies impliquées dans le rôle neuroprotecteur de la transferrine (Tableau S2, Article 2), la régulation à la hausse d'igfbp3 présente un intérêt particulier. Lorsque les niveaux de fer sont élevés, la transferrine peut former des complexes avec igfbp3,¹⁶⁸ empêchant ainsi la liaison à ses récepteurs et ses effets pro-apoptotiques caspase-dépendants (Figure S8, Article

2).¹⁶⁹ De plus, l'internalisation du complexe igfbp3-transferrine permet la libération d'igfbp3 dans les organites cellulaires, induisant ses effets neuroprotecteurs (Figure. S8, Article 2).¹⁷⁰

Le choix de la transferrine parmi les agents chélateurs du fer, comme traitement adjuvant dans les maladies rétinienne, repose sur plusieurs de ses propriétés. D'abord, il s'agit d'un chélateur naturel, non toxique, qui possède un récepteur cellulaire à haute affinité, permettant une régulation des niveaux de fer intracellulaire, et évitant une carence excessive et des effets nocifs pour la cellule.⁶⁵ D'autres agents chélateurs de synthèse (Défériprone, Déféroxamine et Déférasirox), utilisés dans le traitement de patients présentant une surcharge chronique en fer, pourraient être une alternative à la transferrine, mais ils entraînent des effets secondaires au niveau oculaire, tels qu'une toxicité rétinienne et des cataractes (Tableau 1). Ces effets nocifs sont probablement secondaires à un appauvrissement excessif en fer intracellulaire, qui ne peut pas être contre-balancé par les mécanismes régulateurs de la cellule. De plus, ces chélateurs chimiques présentent une demi-vie plus courte que la transferrine (Tableau 1). Leur administration intravitréenne nécessiterait des injections répétées, pouvant aggraver la carence en fer intracellulaire, et leurs effets secondaires.

4.1.3 L'effet neuroprotecteur d'UDCA dans le décollement de rétine

Concernant l'évaluation de l'acide biliaire UDCA dans le DR (Article 3), nous avons démontré qu'UDCA administré oralement peut traverser la barrière hémato-rétinienne altérée chez des patients présentant un DR, et atteindre des concentrations qui se sont avérées neuroprotectrices, par diminution de la mort et par préservation de la structure des photorécepteurs, dans différents modèles *ex vivo* de DR.

La biodisponibilité oculaire d'UDCA par voie orale n'a jamais été évaluée dans les maladies de la rétine. Nous avons montré qu'UDCA peut atteindre les milieux oculaires, en fonction de l'étendue du DR et de la concentration en protéines dans le LSR, suggérant que l'extension de la rupture de la barrière hémato-rétinienne est le principal facteur influençant l'entrée d'UDCA dans l'œil (Figure 1, Article 3). De même, il a été démontré qu'UDCA (administré par voie orale) peut traverser la barrière hémato-encéphalique chez des patients atteints de sclérose latérale amyotrophique,¹³⁹ une affection caractérisée par des altérations au niveau de cette barrière, homologue de la barrière hémato-rétinienne dans le SNC.¹⁷¹ En outre, la tolérance et l'innocuité d'UDCA par voie orale ont été confirmées, et seuls des effets secondaires légers au niveau gastro-intestinal ont été observés chez certains patients (Table S1, Article 3), ce qui est en accord avec les études précédemment publiées.¹³⁹

Les patients chez qui UDCA a été détecté dans les liquides oculaires ont montré un meilleur résultat fonctionnel après chirurgie du DR, et la concentration d'UDCA dans le LSR a été positivement corrélée au gain d'acuité visuelle à 6 mois (Figure 2, Article 3). L'évaluation de l'efficacité d'UDCA chez les patients présentant un DR n'était pas l'objectif principal de l'étude, ce qui aurait pu introduire un biais de sélection, en raison du caractère non randomisé de cette étude. Néanmoins, le fait que la récupération visuelle était meilleure chez les patients présentant un DR plus étendu et avec des concentrations de protéines plus élevées dans le LSR (ce qui était corrélé à des acuités visuelles plus basses au diagnostic et à 6 mois post-opératoire) (Figure 2, Article 3) indique qu'UDCA pourrait protéger de la mort des photorécepteurs pendant un DR. Nous avons montré qu'UDCA, aux plus faibles doses retrouvées dans le LSR des patients, préserve la longueur des segments externes des photorécepteurs dans deux modèles de DR *ex vivo* (Figure 3 et 4, Article 3). De plus, dans une lignée cellulaire de cônes humaines en culture, UDCA augmentait la viabilité cellulaire (Figure 4, Article 3), montrant

que les acides biliaires pourraient protéger spécifiquement les cônes, principales cellules responsables de l'acuité visuelle.

Nous avons montré qu'UDCA et TUDCA pouvaient empêcher la mort cellulaire spontanée et induite dans différents modèles *ex vivo* de DR. Bien que TUDCA ait déjà montré des effets neuroprotecteurs dans des modèles de dégénérescence des photorécepteurs,^{52,128,142} UDCA n'avait jamais été évalué dans le DR. La taurine étant le dérivé d'acide aminé le plus abondant dans la rétine, connu pour ses propriétés neuroprotectrices,¹⁷² l'évaluation d'UDCA était essentielle pour élucider le rôle protecteur des acides biliaires dans l'œil, indépendamment de la fraction taurinique de TUDCA. Nous avons montré qu'UDCA, ainsi que TUDCA, régulent négativement les principales protéines impliquées dans l'apoptose (dépendante et indépendante des caspases) et dans la nécroptose après DR (Figures 3 et 4, Article 3). Des études antérieures ont montré que TUDCA pouvait réguler l'activation des caspases dans un modèle de DR *in vivo*⁵² et dans d'autres modèles de dégénérescence des photorécepteurs.^{128,142} Il a été démontré également que TUDCA prévient la mort des cellules neurales rétiniennes de rat exposées à des concentrations élevées de glucose, par diminution de la translocation nucléaire d'AIF, une voie d'apoptose indépendante des caspases.¹⁵³ Cependant, la régulation par UDCA de l'apoptose caspase-dépendante ou caspase-indépendante n'avait pas été rapportée auparavant dans le DR. Un point important à souligner est que l'activation de la forme clivée de caspase 3 n'a pas été observée dans les explants de rats traités par LSR, à différence des autres modèles. Cela pourrait suggérer que l'apoptose caspase-dépendante n'est pas un mécanisme prépondérant de mort dans la pathologie chez l'homme. En effet, bien que l'activation des caspases a été montré dans des modèles animaux de DR, le traitement par un inhibiteur pan-caspase n'a pas permis de protéger contre la mort de photorécepteurs.⁸ Des explorations complémentaires sont donc nécessaires pour pouvoir conclure sur l'implication de l'apoptose caspase-dépendante dans la mort des photorécepteurs au cours du DR.

Nous avons également montré pour la première fois dans un modèle de dégénérescence rétinienne, que les deux acides biliaires pouvaient efficacement réduire l'activation de RIP kinase, un marqueur de nécroptose, ainsi que la libération de LDH, un marqueur de nécrose. Ces résultats indiquent qu'UDCA et TUDCA peuvent protéger les photorécepteurs, en réduisant à la fois l'apoptose et la nécrose, deux mécanismes impliqués dans la physiopathologie du DR.⁸ Cependant, ces voies de mort pouvant être intriquées (Partie 1.2.2), des explorations additionnelles seront nécessaires pour établir les voies prépondérantes dans le DR.

Bien que les deux acides biliaires étudiés, UDCA et TUDCA, protègent de la mort cellulaire, leur interaction avec les photorécepteurs reste mal comprise, et pourrait probablement être différente pour les acides biliaires conjugués et non conjugués. Des récepteurs d'acide biliaire ont été décrits dans les hépatocytes, l'intestin et le cerveau, et incluent des récepteurs nucléaires (récepteur farsénoïde X (FXR), récepteur de la vitamine D, récepteur Pregnane X, récepteurs glucocorticoïde et minéralocorticoïde) et des récepteurs membranaires (récepteur couplé Takeda-protéine G (TGR5), Sphingosine 1-phosphate receptor 2 (S1PR2) et $\alpha 5\beta 1$ Intégrine (Table 1, Article 1). Nous avons montré l'expression des certains de ces récepteurs par rt-PCR dans des lignées de cônes humains, suggérant qu'il pourrait exister une interaction spécifique des acides biliaires avec ces récepteurs. A ce jour, la seule interaction rapportée dans la rétine est l'interaction entre TUDCA et TRG5 au niveau des cellules ganglionnaires.¹⁵⁷

Des analyses transcriptomiques de fragments de rétine prélevés chez des patients atteints de DR ont montré une implication des gènes participant à la dégénérescence des photorécepteurs et à l'inflammation.^{173,174} Nous avons démontré qu'UDCA est capable d'activer l'expression de gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose, la neurogenèse, l'inflammation et le stress oxydatif (Figure 6, Article 3).

4.1.4 Le lien entre les acides biliaires, le fer et la transferrine

Au cours de ce travail, nous avons montré que les deux molécules étudiées, transferrine et UDCA ont des propriétés neuroprotectrices dans le DR (Article 2 et 3). Il serait donc intéressant d'explorer les mécanismes d'action et les voies de signalisation communs à ces deux molécules pouvant expliquer leur effet sur la survie des photorécepteurs.

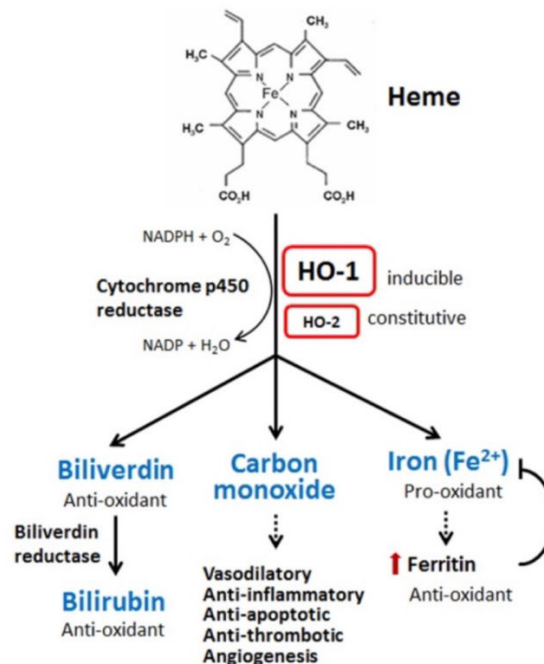
UDCA/TUDCA et transferrine ont montré des effets antioxydants dans plusieurs modèles de dégénérescence rétinienne (Partie 1.3.1.5 et Article 1).^{82,113,175} Bien que le mécanisme antioxydant de la transferrine par chélation du fer libre soit largement accepté, le mécanisme par lequel les acides biliaires exercent une action antioxydante est moins connu. Cependant, il a été suggéré que l'effet antioxydant de TUDCA n'est pas un effet *per se* des acides biliaires, mais un effet indirect, via une limitation de la peroxydation lipidique induite par un excès de fer. En d'autres termes, TUDCA serait antioxydant en présence d'un excès de fer.¹⁷⁶ Il a été également rapporté qu'UDCA exerce des propriétés antioxydantes par interaction directe avec le Fe^{3+} , protégeant ainsi contre la peroxydation lipidique induite par le fer.¹⁷⁷ Il a été montré sur des cellules HepG2 exposées à une surcharge en fer, qu'UDCA diminuait le stress oxydant par augmentation de la synthèse de glutathionne, en activant la voie PI3K/Akt/Nrf2.¹⁷⁸ Cela pourrait expliquer, au moins en partie, l'effet neuroprotecteur d'UDCA et de TUDCA au cours du DR, maladie au cours de laquelle nous avons montré que la concentration en fer est augmentée dans les milieux oculaires (Article 1, Figure 1).

De plus, nous avons montré que les deux molécules neuroprotectrices étudiées, UDCA et transferrine, conduisent à une régulation positive d'*Hmox*, *Mt2* et *Sphk1*. *Hmox1* encode l'enzyme hème oxygenase-1 (HO-1) qui intervient dans la dégradation de l'hème des globules rouges en biliverdine/bilirubine, monoxyde de carbone et Fe^{2+} . Par ailleurs, l'HO-1 a montré des effets antioxydants, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques dans plusieurs modèles de

dégénérescence rétinienne.¹⁷⁹⁻¹⁸¹ Cependant, il a été rapporté que l'HO-1 peut également induire la mort cellulaire par ferroptose.¹⁸² Il a été suggéré qu'à un niveau modéré d'activation, HO-1 exerce un effet cytoprotecteur, tandis que la suractivation de HO-1 serait cytotoxique en raison de l'augmentation excessive du Fe²⁺ labile qui dépasserait les capacités de liaison de la ferritine (Figure 19).¹⁸²

Figure 19. Métabolisme de l'hème

L'hème est dégradé par l'hème-oxygénase (HO) 1, conduisant à la production de biliverdine, de monoxyde de carbone et de fer ferreux (Fe²⁺). La biliverdine est ensuite convertie en bilirubine par la biliverdine réductase. Dans la plupart des conditions, la biliverdine et la bilirubine agissent en tant qu'antioxydants en piégeant ou en neutralisant les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Le monoxyde de carbone joue principalement un rôle dans la transduction de la signalisation, notamment la vasodilatation des vaisseaux sanguins, la production de cytokines anti-inflammatoires, la régulation positive des effecteurs anti-apoptotiques et la thrombose. Le fer ferreux est le principal pro-oxydant de tous les métabolites de l'hème. Toutefois, l'activation de l'HO-1 augmente également l'expression de la ferritine, qui peut lier le fer ferreux et contrebalancer son effet pro-oxydant. Les flèches noires indiquent que la biliverdine se transforme en bilirubine. La flèche en pointillé indique que le monoxyde de carbone sert de régulateur aux activités vasodilatatrices, anti-inflammatoires, anti-apoptotiques, anti-thrombotiques et angiogéniques. La flèche en pointillés sous le fer indique que l'augmentation du fer augmentera la ferritine, ce qui neutralise l'effet pro-oxydant du fer.



Source : d'après Chiang S *et al. Int. J. Mol. Sci.* 2019

Le gène *Mt2*, encode les métallothionéines 2. Ces protéines, notamment la métallothionéine 2A, protègent contre le stress oxydant et la toxicité des ions tels que le zinc et le cuivre, dans diverses formes de dégénérescence rétinienne.¹⁸³ Il a été suggéré qu'en cas d'excès de fer, les métallothionéines peuvent libérer le zinc, qui leur est normalement lié, laissant les domaines de liaison libres pour le fer, ce qui entraîne un effet cytoprotecteur, au moins provisoire.¹⁸⁴ Enfin, le gène *Sphk1* encode pour la protéine sphingosine kinase 1 qui participe à phosphorylation de la sphingosine pour former la sphingosine-1-phosphate. La sphingosine-1-phosphate régule de nombreux processus biologiques, notamment la survie cellulaire, l'inflammation et la neurogenèse.¹⁸⁵ Il est important de signaler qu'un des récepteurs des acides biliaires au niveau du SNC est le S1PR2 (Article 1).¹⁷⁵ Ce récepteur a également été identifié dans la rétine,¹⁸⁵ bien qu'une interaction spécifique entre S1PR2 et UDCA ou TUDCA n'a jamais été rapportée.

4.2 Perspectives

Le DR est une maladie modèle de dégénérescence des photorécepteurs, qui implique plusieurs mécanismes de mort cellulaire. Cependant, les facteurs initiant la mort cellulaire pendant le DR restent inconnus, et l'identification d'une cible commune aux différents mécanismes de mort serait nécessaire pour développer une stratégie neuroprotectrice efficace.

Dans ce but, nous planifions de poursuivre un projet en cours,¹⁵⁹ visant à explorer la composition moléculaire différentielle du vitré par rapport au LSR en utilisant des analyses par protéomique et métabolomique, afin de déceler des cibles moléculaires neurotoxiques contenues dans le LSR.

En l'absence d'une cible unique, l'utilisation de molécules pouvant interférer avec plusieurs mécanismes de mort, ou bien une combinaison de molécules, pourraient constituer des

stratégies neuroprotectrices efficaces. Nous avons démontré que la transferrine et l'UDCA peuvent intervenir par inhibition de plusieurs voies de mort, ce qui les rend éligibles comme potentiels traitements adjuvants à la chirurgie de DR. Nous souhaitons explorer prochainement le potentiel effet additif de ces traitements utilisés en combinaison dans des modèles de DR.

UDCA possède une AMM pour le traitement des cholestases biliaires en France, et notre groupe planifie une étude clinique de Phase III, randomisée et à grande échelle, pour l'évaluation d'UDCA dans le DR. L'évaluation de l'efficacité thérapeutique d'UDCA dans la rétinopathie diabétique, les dystrophies rétiniennes et certaines neuropathies optiques, pourrait également être pertinente car des études dans différents modèles animaux ont montré les propriétés neuroprotectrices des acides biliaires dans ces maladies.¹²⁹

Concernant la transferrine, une *start-up* issue de notre laboratoire poursuit les développements initiés par notre équipe pour le développement d'une molécule à utilisation intra-vitréenne chez l'homme. Nous continuons à explorer le rôle neuroprotecteur de la transferrine, dans un modèle de rétinopathie du prématuré, où la surcharge en fer pourrait être impliquée dans la physiopathologie.¹⁸⁶ Finalement, l'extension des stratégies neuroprotectrices à la population pédiatrique reste un point important à explorer, d'autant plus que la transferrine intervient dans la maturation de la rétine au cours du développement.^{125,126}

5 Annexes

5.1 Annexe 1

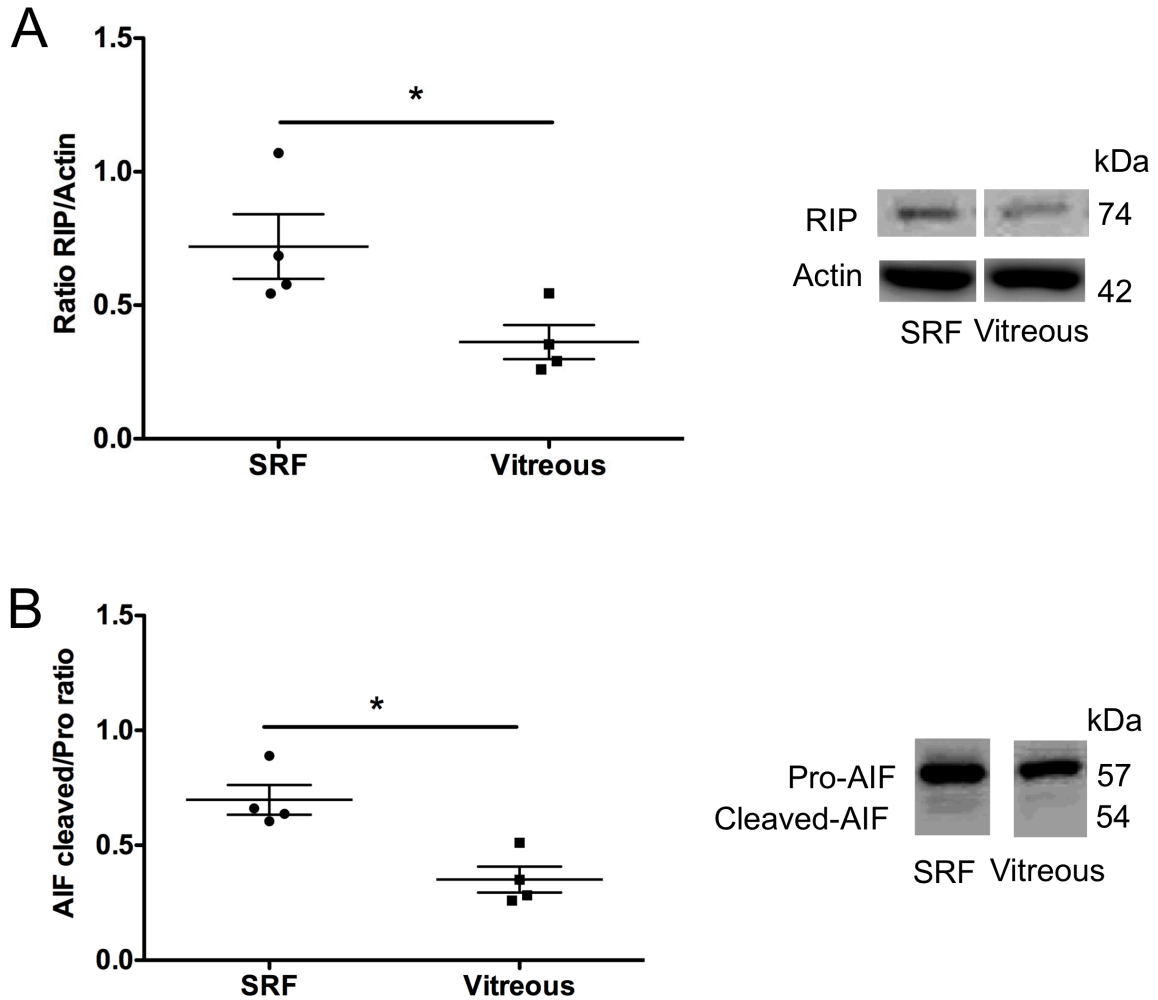
Principales caractéristiques des différents types de mort cellulaire

Morte cellulaire	Apoptose	Necroptose	Autophagie	Ferroptose	Pyroptose
Caractéristiques biochimiques	Activation de la fragmentation de l'ADN oligonucléosomal des caspases	- Baisse des niveaux d'ATP - Activation de RIP1, RIP3 et MLKL	Augmentation de l'activité lysosomale	- Inhibition de xCT - Réduction du GSH - Inhibition de GPX4 - Accumulation de fer et peroxydation lipidique	Libération de la caspase-1 et des cytokines pro-inflammatoires
Caractéristiques morphologiques	- « <i>Blebbing</i> » de la membrane plasmique - Réduction du volume cellulaire et nucléaire - Fragmentation nucléaire	- Rupture de la membrane plasmique - Gonflement des organites - Condensation modérée de la chromatine	Formation d'autolysosomes à double membrane	- Mitochondries de petite taille - Réduction ou disparition de la crête mitochondriale - Rupture de la membrane mitochondriale externe	- Œdème cellulaire - Rupture membranaire - Karyopyknose
Gènes clés	Caspase, P53, Fas, Bcl-2, Bax	LEF1, RIP1, RIP3	ATG5, ATG7, DRAM3, TFEB	GPX4, Nrf2, LSH, TFR1, xCT	Caspase-1, IL-1 β , IL-18
Voies régulatrices	« <i>Death receptor</i> », Mitochondriale, Réticulum endoplasmique, Caspase, P53, Bcl-2	TNF α , TNFR1, TLR3, TRAIL, FasL, ROS, PKC-MAPK-AP-1-	PI3K-AKT-mTOR, MAPK-ERK1/2-mTOR	xCT and Gpx4, MVA, HSF1-HSPB1, p62-Keap1-Nrf2, LSH	Caspase-1, NLRP3

Bcl-2 : B cell lymphoma 2, Bax : Bcl-2-associated X protein, ATP : adénosine triphosphate, RIP : receptor-interacting protein kinase, MLKL : mixed lineage kinase domain-like protein, LEF : Lethal factor, TNF : tumor necrosis factor , TLR : Toll-like receptors, TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand, ROS : reactive oxygen species, PKC : Protein kinase C, MAPK : Mitogen-activated protein kinase, AP : Activator protein, GPX : glutathione peroxidase, Nrf2 : Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2, LSH : lymphoid-specific helicase, GSH : Glutathione ;TFR : transferrin receptor, MVA : mevalonate, HSF : heat shock factor-, HSPB : heat shock factor protein beta, NLRP : NOD-like receptor, IL : interleukine

Source : D'après Mou Y *et al. J Hematol Oncol.* 2019

5.2 Annexe 2



Des explants de rétine de rat ont été exposés au liquide sous-rétinien (SRF) et au vitré (Vitreous) prélevé chez des patients atteints de décollement de rétine rhégmentogène, et mises en culture pendant 6 heures. Une analyse quantitative par western blotting a été effectuée pour RIP kinase (receptor-interacting protein kinase) et AIF (apoptosis inducing-factor).

(A) Le ratio RIP/Actine était significativement plus élevé dans les explants de rétine exposés au liquide sous-rétinien comparés à ceux exposé au vitré. (B) La forme clivée d'AIF rapportée à la forme précurseur non clivée était significativement plus élevée dans les explants de rétine exposés au liquide sous-rétinien comparés à ceux exposé au vitré (* $p < 0.05$, Mann Whitney test).

Bibliographie

1. Wimmers S, Karl MO, Strauss O. Ion channels in the RPE. *Prog Retin Eye Res* 2007;26:263–301.
2. Daruich A, Matet A, Moulin A, et al. Mechanisms of macular edema: Beyond the surface. *Prog Retin Eye Res* 2018;63:20–68.
3. Mitry D, Charteris DG, Fleck BW, et al. The epidemiology of rhegmatogenous retinal detachment: geographical variation and clinical associations. *Br J Ophthalmol* 2010;94:678–684.
4. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009;16:3–11.
5. Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 1973;7:253–266.
6. Cook B, Lewis GP, Fisher SK, Adler R. Apoptotic photoreceptor degeneration in experimental retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:990–996.
7. Arroyo JG, Yang L, Bula D, Chen DF. Photoreceptor apoptosis in human retinal detachment. *Am J Ophthalmol* 2005;139:605–610.
8. Murakami Y, Notomi S, Hisatomi T, et al. Photoreceptor cell death and rescue in retinal detachment and degenerations. *Prog Retin Eye Res* 2013;37:114–140.
9. Zacks DN, Hänninen V, Pantcheva M, et al. Caspase activation in an experimental model of retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1262–1267.
10. Hisatomi T, Sakamoto T, Murata T, et al. Relocalization of apoptosis-inducing factor in photoreceptor apoptosis induced by retinal detachment in vivo. *Am J Pathol* 2001;158:1271–1278.
11. Trichonas G, Murakami Y, Thanos A, et al. Receptor interacting protein kinases mediate retinal detachment-induced photoreceptor necrosis and compensate for inhibition of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:21695–21700.
12. Besirli CG, Chinsky ND, Zheng Q-D, Zacks DN. Autophagy activation in the injured photoreceptor inhibits fas-mediated apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:4193–4199.
13. Nakazawa T, Kayama M, Ryu M, et al. Tumor necrosis factor-alpha mediates photoreceptor death in a rodent model of retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:1384–1391.
14. 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;104:2425–2430.
15. Liu H, Qian J, Wang F, et al. Expression of two endoplasmic reticulum stress markers, GRP78 and GADD153, in rat retinal detachment model and its implication. *Eye Lond Engl* 2010;24:137–144.
16. Zhu H, Qian J, Wang W, et al. RNA interference of GADD153 protects photoreceptors from endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis after retinal detachment. *PLoS One*

2013;8:e59339.

17. Zacks DN, Zheng Q-D, Han Y, et al. FAS-mediated apoptosis and its relation to intrinsic pathway activation in an experimental model of retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:4563–4569.
18. Nakazawa T, Matsubara A, Noda K, et al. Characterization of cytokine responses to retinal detachment in rats. *Mol Vis* 2006;12:867–878.
19. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397:441–446.
20. Vahsen N, Candé C, Brière J-J, et al. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J* 2004;23:4679–4689.
21. Moubarak RS, Yuste VJ, Artus C, et al. Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Mol Cell Biol* 2007;27:4844–4862.
22. Hisatomi T, Nakazawa T, Noda K, et al. HIV protease inhibitors provide neuroprotection through inhibition of mitochondrial apoptosis in mice. *J Clin Invest* 2008;118:2025–2038.
23. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003;114:181–190.
24. Wang H, Sun L, Su L, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Mol Cell* 2014;54:133–146.
25. Wang Z, Jiang H, Chen S, et al. The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell* 2012;148:228–243.
26. Dong K, Zhu H, Song Z, et al. Necrostatin-1 protects photoreceptors from cell death and improves functional outcome after experimental retinal detachment. *Am J Pathol* 2012;181:1634–1641.
27. Murakami Y, Miller JW, Vavvas DG. RIP Kinase-Mediated Necrosis as an Alternative Mechanism of Photoreceptor Death. *Oncotarget* 2011;2:497–509. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3248194/> [Accessed July 2, 2019].
28. Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 2000;103:645–654.
29. Brenner C, Grimm S. The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene* 2006;25:4744–4756.
30. Yang L, Bula D, Arroyo JG, Chen DF. Preventing retinal detachment-associated photoreceptor cell loss in Bax-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:648–654.
31. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008;451:1069–1075.
32. Bo Q, Ma S, Han Q, et al. Role of autophagy in photoreceptor cell survival and death. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2015;25:23–32.
33. Xie J, Zhu R, Peng Y, et al. Tumor necrosis factor- α regulates photoreceptor cell autophagy after retinal detachment. *Sci Rep* 2017;7:17108.
34. Shelby SJ, Angadi PS, Zheng Q-D, et al. Hypoxia inducible factor 1 α contributes to regulation of autophagy in retinal detachment. *Exp Eye Res* 2015;137:84–93.
35. Wubben TJ, Besirli CG, Zacks DN. Pharmacotherapies for Retinal Detachment.

Ophthalmology 2016;123:1553–1562.

36. Sweigard JH, Matsumoto H, Smith KE, et al. Inhibition of the alternative complement pathway preserves photoreceptors after retinal injury. *Sci Transl Med* 2015;7:297ra116.
37. Sene A, Apte RS. Inflammation-Induced Photoreceptor Cell Death. *Adv Exp Med Biol* 2018;1074:203–208.
38. Lo ACY, Woo TTY, Wong RLM, Wong D. Apoptosis and other cell death mechanisms after retinal detachment: implications for photoreceptor rescue. *Ophthalmol J Int Ophtalmol Int J Ophthalmol Z Augenheilkd* 2011;226 Suppl 1:10–17.
39. Monteiro MC, Coleman MD, Hill EJ, et al. Neuroprotection in Neurodegenerative Disease: From Basic Science to Clinical Applications. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017:2949102.
40. Schneider EW, Geraets RL, Johnson MW. Pars plana vitrectomy without adjuvant procedures for repair of primary rhegmatogenous retinal detachment. *Retina Phila Pa* 2012;32:213–219.
41. Ross WH. Visual recovery after macula-off retinal detachment. *Eye Lond Engl* 2002;16:440–446.
42. Campo RV, Sipperley JO, Sneed SR, et al. Pars plana vitrectomy without scleral buckle for pseudophakic retinal detachments. *Ophthalmology* 1999;106:1811–1815; discussion 1816.
43. Frings A, Markau N, Katz T, et al. Visual recovery after retinal detachment with macula-off: is surgery within the first 72 h better than after? *Br J Ophthalmol* 2016;100:1466–1469.
44. Mitry D, Awan MA, Borooh S, et al. Long-term visual acuity and the duration of macular detachment: findings from a prospective population-based study. *Br J Ophthalmol* 2013;97:149–152.
45. Tani P, Robertson DM, Langworthy A. Prognosis for central vision and anatomic reattachment in rhegmatogenous retinal detachment with macula detached. *Am J Ophthalmol* 1981;92:611–620.
46. Grizzard WS, Hilton GF, Hammer ME, Taren D. A multivariate analysis of anatomic success of retinal detachments treated with scleral buckling. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 1994;32:1–7.
47. Burton TC, Lambert RW. A predictive model for visual recovery following retinal detachment surgery. *Ophthalmology* 1978;85:619–625.
48. Matsui A, Toshida H, Honda R, et al. Preoperative and Postoperative Optical Coherence Tomography Findings in Patients with Rhegmatogenous Retinal Detachment Involving the Macular Region. *ISRN Ophthalmol* 2013;2013:1–6. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/isrn.ophthalmology/2013/426867/> [Accessed April 29, 2015].
49. Hagimura N, Suto K, Iida T, Kishi S. Optical coherence tomography of the neurosensory retina in rhegmatogenous retinal detachment. *Am J Ophthalmol* 2000;129:186–190.
50. Joe SG, Kim YJ, Chae JB, et al. Structural Recovery of the Detached Macula after Retinal Detachment Repair as Assessed by Optical Coherence Tomography. *Korean J Ophthalmol* 2013;27:178. Available at: <http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3341/kjo.2013.27.3.178> [Accessed April 29, 2015].

51. Terauchi G, Shinoda K, Matsumoto CS, et al. Recovery of photoreceptor inner and outer segment layer thickness after reattachment of rhegmatogenous retinal detachment. *Br J Ophthalmol* 2015. Available at: <http://bjophthalmol.com/cgi/doi/10.1136/bjophthalmol-2014-306252> [Accessed April 29, 2015].
52. Mantopoulos D, Murakami Y, Comander J, et al. Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) protects photoreceptors from cell death after experimental retinal detachment. *PloS One* 2011;6:e24245.
53. Huang W, Li G, Qiu J, et al. Protective effects of resveratrol in experimental retinal detachment. *PloS One* 2013;8:e75735.
54. Yang L, Kim J-H, Kovacs KD, et al. Minocycline inhibition of photoreceptor degeneration. *Arch Ophthalmol Chic Ill* 1960 2009;127:1475–1480.
55. Scholz R, Sobotka M, Caramoy A, et al. Minocycline counter-regulates pro-inflammatory microglia responses in the retina and protects from degeneration. *J Neuroinflammation* 2015;12:209.
56. Ding J, Yang N, Yan Y, et al. Rapamycin Inhibited Photoreceptor Necroptosis and Protected the Retina by Activation of Autophagy in Experimental Retinal Detachment. *Curr Eye Res* 2019;44:739–745.
57. Wassmer SJ, Leonard BC, Coupland SG, et al. Overexpression of the X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protects Against Retinal Degeneration in a Feline Model of Retinal Detachment. *Hum Gene Ther* 2017;28:482–492.
58. Yabal M, Jost PJ. XIAP as a regulator of inflammatory cell death: the TNF and RIP3 angle. *Mol Cell Oncol* 2014;2. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4905225/> [Accessed July 9, 2019].
59. Roh MI, Murakami Y, Thanos A, et al. Edaravone, an ROS scavenger, ameliorates photoreceptor cell death after experimental retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:3825–3831.
60. Sun X, Xu X, Wang F, et al. Nerve growth factor helps protect retina in experimental retinal detachment. *Ophthalmol J Int Ophthalmol Int J Ophthalmol Z Augenheilkd* 2008;222:58–61.
61. Choi JA, Kim YJ, Seo B-R, et al. Potential Role of Zinc Dyshomeostasis in Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Activation and Photoreceptor Cell Death in Experimental Retinal Detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018;59:3058–3068.
62. Kim B, Kusibati R, Heisler-Taylor T, et al. MIF Inhibitor ISO-1 Protects Photoreceptors and Reduces Gliosis in Experimental Retinal Detachment. *Sci Rep* 2017;7:14336.
63. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 2010;142:24–38.
64. Eid R, Arab NTT, Greenwood MT. Iron mediated toxicity and programmed cell death: A review and a re-examination of existing paradigms. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2017;1864:399–430.
65. He X, Hahn P, Iacovelli J, et al. Iron homeostasis and toxicity in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2007;26:649–673.
66. Shichi H. Microsomal electron transfer system of bovine retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* 1969;8:60–68.

67. Yau KW, Baylor DA. Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells. *Annu Rev Neurosci* 1989;12:289–327.
68. Moiseyev G, Takahashi Y, Chen Y, et al. RPE65 is an iron(II)-dependent isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *J Biol Chem* 2006;281:2835–2840.
69. Ugarte M, Osborne NN, Brown LA, Bishop PN. Iron, zinc, and copper in retinal physiology and disease. *Surv Ophthalmol* 2013;58:585–609.
70. Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:940–959.
71. Yefimova MG, Jeanny JC, Guillonnet X, et al. Iron, ferritin, transferrin, and transferrin receptor in the adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2343–2351.
72. Laicine EM, Haddad A. Transferrin, one of the major vitreous proteins, is produced within the eye. *Exp Eye Res* 1994;59:441–445.
73. Chen L, Dentchev T, Wong R, et al. Increased expression of ceruloplasmin in the retina following photic injury. *Mol Vis* 2003;9:151–158.
74. Gnana-Prakasam JP, Martin PM, Mysona BA, et al. Hfeidin expression in mouse retina and its regulation via lipopolysaccharide/Toll-like receptor-4 pathway independent of Hfe. *Biochem J* 2008;411:79–88. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3731152/> [Accessed July 22, 2019].
75. Farina M, Avila DS, da Rocha JBT, Aschner M. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochem Int* 2013;62:575–594.
76. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of iron in oxygen radical reactions. *Methods Enzymol* 1984;105:47–56.
77. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell* 2012;149:1060–1072. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286741200520X> [Accessed September 25, 2019].
78. Rogers BS, Symons RCA, Komeima K, et al. Differential sensitivity of cones to iron-mediated oxidative damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:438–445.
79. Yefimova MG, Jeanny J-C, Keller N, et al. Impaired retinal iron homeostasis associated with defective phagocytosis in Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:537–545.
80. Imamura T, Hirayama T, Tsuruma K, et al. Hydroxyl radicals cause fluctuation in intracellular ferrous ion levels upon light exposure during photoreceptor cell death. *Exp Eye Res* 2014;129:24–30.
81. Picard E, Ranchon-Cole I, Jonet L, et al. Light-induced retinal degeneration correlates with changes in iron metabolism gene expression, ferritin level, and aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:1261–1274.
82. Picard E, Le Rouzic Q, Oudar A, et al. Targeting iron-mediated retinal degeneration by local delivery of transferrin. *Free Radic Biol Med* 2015;89:1105–1121.
83. Wong RW, Richa DC, Hahn P, et al. Iron toxicity as a potential factor in AMD. *Retina Phila Pa* 2007;27:997–1003.
84. Chen H, Lukas TJ, Du N, et al. Dysfunction of the retinal pigment epithelium with age:

- increased iron decreases phagocytosis and lysosomal activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:1895–1902.
85. Li Y, Song D, Song Y, et al. Iron-induced Local Complement Component 3 (C3) Up-regulation via Non-canonical Transforming Growth Factor (TGF)- β Signaling in the Retinal Pigment Epithelium. *J Biol Chem* 2015;290:11918–11934. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4424331/> [Accessed September 25, 2019].
86. Gelfand BD, Wright CB, Kim Y, et al. Iron Toxicity in the Retina Requires Alu RNA and the NLRP3 Inflammasome. *Cell Rep* 2015;11:1686–1693.
87. Gnana-Prakasam JP, Ananth S, Prasad PD, et al. Expression and iron-dependent regulation of succinate receptor GPR91 in retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:3751–3758.
88. Totsuka K, Ueta T, Uchida T, et al. Oxidative stress induces ferroptotic cell death in retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 2019;181:316–324.
89. Kumar P, Nag TC, Jha KA, et al. Experimental oral iron administration: Histological investigations and expressions of iron handling proteins in rat retina with aging. *Toxicology* 2017;392:22–31.
90. Song D, Kanu LN, Li Y, et al. AMD-like retinopathy associated with intravenous iron. *Exp Eye Res* 2016;151:122–133.
91. Chowers I, Wong R, Dentchev T, et al. The iron carrier transferrin is upregulated in retinas from patients with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:2135–2140.
92. Wysokinski D, Szaflik J, Sklodowska A, et al. The A Allele of the -576G>A polymorphism of the transferrin gene is associated with the increased risk of age-related macular degeneration in smokers. *Tohoku J Exp Med* 2011;223:253–261.
93. Shu W, Dunaief JL. Potential Treatment of Retinal Diseases with Iron Chelators. *Pharm Basel Switz* 2018;11.
94. Howland MA. Risks of parenteral deferoxamine for acute iron poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol* 1996;34:491–497.
95. Jauregui R, Park KS, Bassuk AG, et al. Deferoxamine-induced electronegative ERG responses. *Doc Ophthalmol Adv Ophthalmol* 2018;137:15–23.
96. Lakhanpal V, Schocket SS, Jiji R. Deferoxamine (Desferal)-induced toxic retinal pigmentary degeneration and presumed optic neuropathy. *Ophthalmology* 1984;91:443–451.
97. Simon S, Athanasiov PA, Jain R, et al. Desferrioxamine-related ocular toxicity: a case report. *Indian J Ophthalmol* 2012;60:315–317.
98. Arora A, Wren S, Gregory Evans K. Desferrioxamine related maculopathy: a case report. *Am J Hematol* 2004;76:386–388.
99. Cappellini MD, Cohen A, Piga A, et al. A phase 3 study of deferasirox (ICL670), a once-daily oral iron chelator, in patients with beta-thalassemia. *Blood* 2006;107:3455–3462.
100. Chaudhary K, Promsote W, Ananth S, et al. Iron Overload Accelerates the Progression of Diabetic Retinopathy in Association with Increased Retinal Renin Expression. *Sci Rep* 2018;8:3025.
101. Piga A, Galanello R, Forni GL, et al. Randomized phase II trial of deferasirox (Exjade, ICL670), a once-daily, orally-administered iron chelator, in comparison to deferoxamine in

- thalassemia patients with transfusional iron overload. *Haematologica* 2006;91:873–880.
102. Díaz-García JD, Gallegos-Villalobos A, Gonzalez-Espinoza L, et al. Deferasirox nephrotoxicity-the knowns and unknowns. *Nat Rev Nephrol* 2014;10:574–586.
103. Pan Y, Keane PA, Sadun AA, Fawzi AA. Optical coherence tomography findings in deferasirox-related maculopathy. *Retin Cases Brief Rep* 2010;4:229–232.
104. Masera N, Rescaldani C, Azzolini M, et al. Development of lens opacities with peculiar characteristics in patients affected by thalassemia major on chelating treatment with deferasirox (ICL670) at the Pediatric Clinic in Monza, Italy. *Haematologica* 2008;93:e9-10.
105. Kontoghiorghes GJ. New concepts of iron and aluminium chelation therapy with oral L1 (deferiprone) and other chelators. A review. *The Analyst* 1995;120:845–851.
106. Wu S-F, Peng C-T, Wu K-H, Tsai C-H. Liver fibrosis and iron levels during long-term deferiprone treatment of thalassemia major patients. *Hemoglobin* 2006;30:215–218.
107. Tricta F, Uetrecht J, Galanello R, et al. Deferiprone-induced agranulocytosis: 20 years of clinical observations. *Am J Hematol* 2016;91:1026–1031.
108. El-Beshlawy AM, El-Alfy MS, Sari TT, et al. Continuation of deferiprone therapy in patients with mild neutropenia may not lead to a more severe drop in neutrophil count. *Eur J Haematol* 2014;92:337–340.
109. Song D, Zhao L, Li Y, et al. The oral iron chelator deferiprone protects against systemic iron overload-induced retinal degeneration in hepcidin knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:4525–4532.
110. Hadziahmetovic M, Song Y, Wolkow N, et al. The oral iron chelator deferiprone protects against iron overload-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:959–968.
111. Taneja R, Malik P, Sharma M, Agarwal MC. Multiple transfused thalassemia major: ocular manifestations in a hospital-based population. *Indian J Ophthalmol* 2010;58:125–130.
112. Mehdizadeh M, Nowroozadeh MH. Posterior subcapsular opacity in two patients with thalassaemia major following deferiprone consumption. *Clin Exp Optom* 2009;92:392–394.
113. Picard E, Jonet L, Sergeant C, et al. Overexpressed or intraperitoneally injected human transferrin prevents photoreceptor degeneration in rd10 mice. *Mol Vis* 2010;16:2612–2625.
114. Goya N, Miyazaki S, Kodate S, Ushio B. A family of congenital atransferrinemia. *Blood* 1972;40:239–245.
115. Freedman MH, Grisaru D, Olivieri N, et al. Pulmonary syndrome in patients with thalassemia major receiving intravenous deferoxamine infusions. *Am J Dis Child* 1960 1990;144:565–569.
116. Kontoghiorghes GJ. Deferasirox: uncertain future following renal failure fatalities, agranulocytosis and other toxicities. *Expert Opin Drug Saf* 2007;6:235–239.
117. Chan YK, Sung HK, Sweeney G. Iron metabolism and regulation by neutrophil gelatinase-associated lipocalin in cardiomyopathy. *Clin Sci Lond Engl* 1979 2015;129:851–862.
118. Beau-Salinas F, Guitteny MA, Donadieu J, et al. High doses of deferiprone may be associated with cerebellar syndrome. *BMJ* 2009;338:a2319.
119. Di Nicola M, Barteselli G, Dell’Arti L, et al. Functional and Structural Abnormalities in

- Deferoxamine Retinopathy: A Review of the Literature. *BioMed Res Int* 2015;2015:249617.
120. Wong A, Alder V, Robertson D, et al. Liver iron depletion and toxicity of the iron chelator deferiprone (L1, CP20) in the guinea pig. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med* 1997;10:247–256.
121. Taneja R, Malik P, Sharma M, Agarwal MC. Multiple transfused thalassemia major: ocular manifestations in a hospital-based population. *Indian J Ophthalmol* 2010;58:125–130.
122. Picard E, Fontaine I, Jonet L, et al. The protective role of transferrin in Müller glial cells after iron-induced toxicity. *Mol Vis* 2008;14:928–941.
123. Bruinink A, Sidler C, Birchler F. Neurotrophic effects of transferrin on embryonic chick brain and neural retinal cell cultures. *Int J Dev Neurosci Off J Int Soc Dev Neurosci* 1996;14:785–795.
124. Hyndman AG, Hockberger PE, Zeevalk GD, Connor JA. Transferrin can alter physiological properties of retinal neurons. *Brain Res* 1991;561:318–323.
125. Zeevalk GD, Hyndman AG. Transferrin concentration and location during formation of chick retina: developmental correlates. *Neurosci Lett* 1988;92:149–154.
126. Zeevalk GD, Hyndman AG. Transferrin in chick retina: distribution and location during development. *Brain Res* 1987;465:231–241.
127. Monte MJ, Marin JGG, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol* 2009;15:804–816.
128. Boatright JH, Moring AG, McElroy C, et al. Tool from ancient pharmacopoeia prevents vision loss. *Mol Vis* 2006;12:1706–1714.
129. Vang S, Longley K, Steer CJ, Low WC. The Unexpected Uses of Urso- and Tauroursodeoxycholic Acid in the Treatment of Non-liver Diseases. *Glob Adv Health Med Improv Healthc Outcomes Worldw* 2014;3:58–69.
130. Dionísio PA, Amaral JD, Ribeiro MF, et al. Amyloid- β pathology is attenuated by tauroursodeoxycholic acid treatment in APP/PS1 mice after disease onset. *Neurobiol Aging* 2015;36:228–240.
131. Lo AC, Callaerts-Vegh Z, Nunes AF, et al. Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) supplementation prevents cognitive impairment and amyloid deposition in APP/PS1 mice. *Neurobiol Dis* 2013;50:21–29.
132. Ramalho RM, Nunes AF, Dias RB, et al. Tauroursodeoxycholic acid suppresses amyloid β -induced synaptic toxicity in vitro and in APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging* 2013;34:551–561.
133. Nunes AF, Amaral JD, Lo AC, et al. TUDCA, a bile acid, attenuates amyloid precursor protein processing and amyloid- β deposition in APP/PS1 mice. *Mol Neurobiol* 2012;45:440–454.
134. Pan X, Elliott CT, McGuinness B, et al. Metabolomic Profiling of Bile Acids in Clinical and Experimental Samples of Alzheimer’s Disease. *Metabolites* 2017;7.
135. Abdelkader NF, Safar MM, Salem HA. Ursodeoxycholic Acid Ameliorates Apoptotic Cascade in the Rotenone Model of Parkinson’s Disease: Modulation of Mitochondrial Perturbations. *Mol Neurobiol* 2016;53:810–817.
136. Castro-Caldas M, Carvalho AN, Rodrigues E, et al. Tauroursodeoxycholic acid prevents MPTP-induced dopaminergic cell death in a mouse model of Parkinson’s disease. *Mol*

Neurobiol 2012;46:475–486.

137. Rosa AI, Fonseca I, Nunes MJ, et al. Novel insights into the antioxidant role of tauroursodeoxycholic acid in experimental models of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017;1863:2171–2181.
138. Keene CD, Rodrigues CM, Eich T, et al. A bile acid protects against motor and cognitive deficits and reduces striatal degeneration in the 3-nitropropionic acid model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 2001;171:351–360.
139. Parry GJ, Rodrigues CMP, Aranha MM, et al. Safety, tolerability, and cerebrospinal fluid penetration of ursodeoxycholic Acid in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neuropharmacol* 2010;33:17–21.
140. Min J-H, Hong Y-H, Sung J-J, et al. Oral solubilized ursodeoxycholic acid therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a randomized cross-over trial. *J Korean Med Sci* 2012;27:200–206.
141. Elia AE, Lalli S, Monsurrò MR, et al. Tauroursodeoxycholic acid in the treatment of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol* 2016;23:45–52.
142. Phillips MJ, Walker TA, Choi H-Y, et al. Tauroursodeoxycholic acid preservation of photoreceptor structure and function in the rd10 mouse through postnatal day 30. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2148–2155.
143. Oveson BC, Iwase T, Hackett SF, et al. Constituents of bile, bilirubin and TUDCA, protect against oxidative stress-induced retinal degeneration. *J Neurochem* 2011;116:144–153.
144. Drack AV, Dumitrescu AV, Bhattarai S, et al. TUDCA slows retinal degeneration in two different mouse models of retinitis pigmentosa and prevents obesity in Bardet-Biedl syndrome type 1 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:100–106.
145. Fernández-Sánchez L, Lax P, Pinilla I, et al. Tauroursodeoxycholic acid prevents retinal degeneration in transgenic P23H rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:4998–5008.
146. Lawson EC, Bhatia SK, Han MK, et al. Tauroursodeoxycholic Acid Protects Retinal Function and Structure in rd1 Mice. *Adv Exp Med Biol* 2016;854:431–436.
147. Zhang T, Baehr W, Fu Y. Chemical Chaperone TUDCA Preserves Cone Photoreceptors in a Mouse Model of Leber Congenital Amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:3349–3356. Available at: <http://iovs.arvojournals.org/Article.aspx?doi=10.1167/iovs.12-9851> [Accessed April 29, 2015].
148. Fu Y, Zhang T. Pathophysiological mechanism and treatment strategies for Leber congenital amaurosis. *Adv Exp Med Biol* 2014;801:791–796.
149. Gómez-Vicente V, Lax P, Fernández-Sánchez L, et al. Neuroprotective Effect of Tauroursodeoxycholic Acid on N-Methyl-D-Aspartate-Induced Retinal Ganglion Cell Degeneration. *PloS One* 2015;10:e0137826.
150. Kitamura Y, Bikbova G, Baba T, et al. In vivo effects of single or combined topical neuroprotective and regenerative agents on degeneration of retinal ganglion cells in rat optic nerve crush model. *Sci Rep* 2019;9:101.
151. Xia H, Nan Y, Huang X, et al. Effects of Tauroursodeoxycholic Acid and Alpha-Lipoic-Acid on the Visual Response Properties of Cat Retinal Ganglion Cells: An In Vitro Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:6638–6645.

152. Chao de la Barca JM, Simard G, Amati-Bonneau P, et al. The metabolomic signature of Leber's hereditary optic neuropathy reveals endoplasmic reticulum stress. *Brain J Neurol* 2016;139:2864–2876.
153. Gaspar JM, Martins A, Cruz R, et al. Tauroursodeoxycholic acid protects retinal neural cells from cell death induced by prolonged exposure to elevated glucose. *Neuroscience* 2013;253:380–388.
154. Oshitari T, Bikbova G, Yamamoto S. Increased expression of phosphorylated c-Jun and phosphorylated c-Jun N-terminal kinase associated with neuronal cell death in diabetic and high glucose exposed rat retinas. *Brain Res Bull* 2014;101:18–25.
155. Chung Y-R, Choi JA, Koh J-Y, Yoon YH. Ursodeoxycholic Acid Attenuates Endoplasmic Reticulum Stress-Related Retinal Pericyte Loss in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *J Diabetes Res* 2017;2017:1763292.
156. Ouyang H, Mei X, Zhang T, et al. Ursodeoxycholic acid ameliorates diabetic retinopathy via reducing retinal inflammation and reversing the breakdown of blood-retinal barrier. *Eur J Pharmacol* 2018;840:20–27.
157. Beli E, Yan Y, Moldovan L, et al. Restructuring of the Gut Microbiome by Intermittent Fasting Prevents Retinopathy and Prolongs Survival in db/db Mice. *Diabetes* 2018;67:1867–1879.
158. Rubio DM, Schoenbaum EE, Lee LS, et al. Defining Translational Research: Implications for Training. *Acad Med J Assoc Am Med Coll* 2010;85:470–475. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2829707/> [Accessed September 9, 2019].
159. Kowalczyk L, Matet A, Dor M, et al. Proteome and Metabolome of Subretinal Fluid in Central Serous Chorioretinopathy and Rhegmatogenous Retinal Detachment: A Pilot Case Study. *Transl Vis Sci Technol* 2018;7:3.
160. Quintyn J-C, Brasseur G. Subretinal fluid in primary rhegmatogenous retinal detachment: physiopathology and composition. *Surv Ophthalmol* 2004;49:96–108.
161. Winkler J, Hoerauf H. [The retinal organ culture--a model system for the examination of the early cytoskeletal reaction pattern after retinal detachment]. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2008;225:269–275.
162. Cook B, Lewis GP, Fisher SK, Adler R. Apoptotic photoreceptor degeneration in experimental retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:990–996.
163. Ghosh F, Åkerström B, Bergwik J, et al. Acute tissue reactions, inner segment pathology, and effects of the antioxidant α 1-microglobulin in an in vitro model of retinal detachment. *Exp Eye Res* 2018;173:13–23.
164. Cebulla CM, Zelinka CP, Scott MA, et al. A chick model of retinal detachment: cone rich and novel. *PLoS One* 2012;7:e44257.
165. Anderson DH, Stern WH, Fisher SK, et al. Retinal detachment in the cat: the pigment epithelial-photoreceptor interface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24:906–926.
166. Guajardo MH, Terrasa AM, Catalá A. Lipid-protein modifications during ascorbate-Fe²⁺ peroxidation of photoreceptor membranes: protective effect of melatonin. *J Pineal Res* 2006;41:201–210.
167. Lesnikov VA, Lesnikova MP, Deeg HJ. Neuroimmunomodulation and aging: a role for transferrin and the hypothalamus/thymus axis. *Curr Aging Sci* 2013;6:21–28.

168. Miljuš G, Malenković V, Đukanović B, et al. IGFBP-3/transferrin/transferrin receptor 1 complexes as principal mediators of IGFBP-3 delivery to colon cells in non-cancer and cancer tissues. *Exp Mol Pathol* 2015;98:431–438.
169. Johnson MA, Firth SM. IGFBP-3: a cell fate pivot in cancer and disease. *Growth Horm IGF Res Off J Growth Horm Res Soc Int IGF Res Soc* 2014;24:164–173.
170. Storch S, Kübler B, Höning S, et al. Transferrin binds insulin-like growth factors and affects binding properties of insulin-like growth factor binding protein-3. *FEBS Lett* 2001;509:395–398.
171. Brylev LV, Zakharova MN, Zavalishin IA, Gulyaeva NV. Disruption of blood-brain barrier in amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Neurochem J* 2012;6:64–70. Available at: <https://doi.org/10.1134/S1819712411040064> [Accessed July 15, 2019].
172. Ripps H, Shen W. Review: taurine: a “very essential” amino acid. *Mol Vis* 2012;18:2673–2686.
173. Delyfer M-N, Aït-Ali N, Camara H, et al. Transcriptomic analysis of human retinal surgical specimens using *joRNAI*. *J Vis Exp JoVE* 2013.
174. Delyfer M-N, Raffelsberger W, Mercier D, et al. Transcriptomic analysis of human retinal detachment reveals both inflammatory response and photoreceptor death. *PloS One* 2011;6:e28791.
175. Daruich A, Picard E, Boatright JH, Behar-Cohen F. The bile acids urso- and tauroursodeoxycholic acid as neuroprotective therapies in retinal disease. *Mol Vis* 2019.
176. Sreejayan N, von Ritter C. Effect of bile acids on lipid peroxidation: the role of iron. *Free Radic Biol Med* 1998;25:50–56.
177. Lapenna D, Ciofani G, Festi D, et al. Antioxidant properties of ursodeoxycholic acid. *Biochem Pharmacol* 2002;64:1661–1667.
178. Arisawa S, Ishida K, Kameyama N, et al. Ursodeoxycholic acid induces glutathione synthesis through activation of PI3K/Akt pathway in HepG2 cells. *Biochem Pharmacol* 2009;77:858–866.
179. Li L, Du G, Wang D, et al. Overexpression of Heme Oxygenase-1 in Mesenchymal Stem Cells Augments Their Protection on Retinal Cells In Vitro and Attenuates Retinal Ischemia/Reperfusion Injury In Vivo against Oxidative Stress. *Stem Cells Int* 2017;2017:4985323.
180. Fan J, Xu G, Jiang T, Qin Y. Pharmacologic induction of heme oxygenase-1 plays a protective role in diabetic retinopathy in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:6541–6556.
181. Himori N, Maruyama K, Yamamoto K, et al. Critical neuroprotective roles of heme oxygenase-1 induction against axonal injury-induced retinal ganglion cell death. *J Neurosci Res* 2014;92:1134–1142.
182. Chiang S-K, Chen S-E, Chang L-C. A Dual Role of Heme Oxygenase-1 in Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 2018;20. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6337503/> [Accessed October 8, 2019].
183. Ito Y, Tanaka H, Hara H. The potential roles of metallothionein as a therapeutic target for cerebral ischemia and retinal diseases. *Curr Pharm Biotechnol* 2013;14:400–407.
184. Ćurko-Cofek B, Grubić Kezele T, Barac-Latas V. Hepcidin and metallothioneins as molecular base for sex-dependent differences in clinical course of experimental autoimmune

encephalomyelitis in chronic iron overload. *Med Hypotheses* 2017;107:51–54.

185. Porter H, Qi H, Prabhu N, et al. Characterizing Sphingosine Kinases and Sphingosine 1-Phosphate Receptors in the Mammalian Eye and Retina. *Int J Mol Sci* 2018;19.

186. Dani C, Reali MF, Bertini G, et al. The role of blood transfusions and iron intake on retinopathy of prematurity. *Early Hum Dev* 2001;62:57–63.

Table des illustrations

Figure 1. Schéma de l'œil humain.	13
Figure 2. Anatomie macroscopique de la rétine en rétinophotographie couleur.	16
Figure 3. Les couches cellulaires composant la rétine.	18
Figure 4. Photorécepteurs	19
Figure 5. Adhésion des photorécepteurs à l'épithélium pigmentaire.	23
Figure 6. La barrière hématorétinienne interne.	25
Figure 7. La barrière hématorétinienne externe.	26
Figure 8. Le décollement de rétine.	27
Figure 9. Décollement de rétine rhegmatogène.	28
Figure 10. Rétinophotographie et tomographie par cohérence optique chez un patient présentant un décollement de rétine, avant et après prise en charge chirurgicale.	30
Figure 11. Apoptose Caspase-dépendante.	34
Figure 12. Apoptose caspase-indépendante : voie AIF (Apoptosis-inducing factor).	36
Figure 13. Voie RIP (receptor-interacting protein).	37
Figure 14. Voies d'Autophagie	40
Figure 15. Schéma des mécanismes d'apoptose dans le décollement de rétine et molécules expérimentales capables de l'inhiber (encadrées en rouge).	47
Figure 16. Métabolisme du fer	50
Figure 17. Transport du fer au niveau cellulaire	51
Figure 18. Transport, stockage et régulation du fer dans le complexe photorécepteurs-épithélium pigmentaire de la rétine	53
Figure 19. Métabolisme de l'hème	164