

# Table des matières

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>I- Anatomie et fonction de l'œil.....</b>	<b>2</b>
<b>1-1 Le segment antérieur .....</b>	<b>2</b>
<b>1-2 Le segment postérieur.....</b>	<b>3</b>
1-2-1 La rétine neurale .....	4
1-2-1-1 Photorécepteurs.....	5
1-2-1-1-1 Bâtonnets.....	6
1-2-1-1-2 Cônes .....	6
1-2-1-1-3 Phototransduction.....	6
1-2-1-1-4 Différences régionales dans la rétine .....	8
1-2-1-2 Les cellules bipolaires.....	8
1-2-1-3 Les cellules horizontales.....	9
1-2-1-4 Les cellules amacrines.....	10
1-2-1-5 Les cellules ganglionnaires.....	11
1-2-1-6 Les cellules gliales .....	11
1-2-1-6-1 Les astrocytes.....	11
1-2-1-6-2 Les cellules gliales de Müller .....	11
1-2-1-6-3 Les cellules microgliales .....	12
1-2-2 L'épithélium pigmentaire rétinien .....	13
1-2-2-1 Généralités.....	13
1-2-2-2 Fonctions de l'EPR .....	14
1-2-3 Les réseaux vasculaires .....	15
1-2-3-1 Le réseau vasculaire rétinien.....	15
1-2-3-2 Le système vasculaire choroidien.....	17
<b>II- DMLA.....</b>	<b>18</b>
<b>2-1 Généralités.....</b>	<b>18</b>
<b>2-2 Epidémiologie.....</b>	<b>20</b>
<b>2-3 MLA.....</b>	<b>21</b>
<b>2-4 DMLA .....</b>	<b>23</b>
2-4-1 La forme exsudative.....	23
2-4-2 La forme atrophique .....	25
2-4-3 Facteurs de risques .....	28
2-4-3-1 Facteurs environnementaux .....	28
2-4-3-2 Facteurs génétiques .....	29
<b>III- Le système des phagocytes mononucléés .....</b>	<b>32</b>
<b>3-1 La famille des chimiokines.....</b>	<b>32</b>
3-1-1 Classification .....	32
3-1-2 Les récepteurs chimiokines .....	34
3-1-3 Interactions Chimiokine-Récepteur .....	34

3-1-4 Implication de CCL2/CCR2 et CX3CL1/CX3CR1 dans les pathologies .....	34
3-1-4-1 L'axe CX3CL1/CX3CR1.....	35
3-1-4-2 Axe CCL2/CCR2.....	37
<b>3-2 Les phagocytes mononucléés .....</b>	<b>38</b>
3-2-1 Les Monocytes .....	40
3-2-1-1 Les monocytes humains .....	40
3-2-1-1-1 Les monocytes CD14++CD16-: les monocytes « classiques » .....	40
3-2-1-1-2 Les monocytes CD14+CD16++: les monocytes non classiques .....	41
3-2-1-1-3 Les monocytes CD14++CD16+: les monocytes intermédiaires .....	41
3-2-1-2 Les monocytes murins .....	41
3-2-1-2-1 Les monocytes inflammatoires (classiques) .....	43
3-2-1-2-2 Les monocytes résidents (non classiques).....	43
3-2-2 Différenciation des monocytes en macrophages .....	44
3-2-2-1 Les macrophages M1 .....	45
3-2-2-2 Les macrophages M2 .....	46
3-2-2-3 Lien entre les Mo et les Mp.....	47
3-2-3 Microglies .....	47
3-2-3-1 Origines.....	48
3-2-3-2 Principales fonctions .....	49
3-2-3-3 Activation des CM (à long terme).....	50
<b>IV- DMLA et inflammation.....</b>	<b>53</b>
<b>4-1 Privilège immun de l'œil .....</b>	<b>53</b>
4-1-1 Barrière hémato-rétinienne .....	53
4-1-2 Facteurs cellulaires et moléculaires .....	53
<b>4-2 Inflammation dans la DMLA .....</b>	<b>55</b>
4-2-1 Les changements biologiques et histologiques .....	55
4-2-2 Drusen .....	55
4-2-3 Le complément .....	56
4-2-4 Marqueurs plasmatiques.....	58
4-2-5 Inflammation sous-rétinienne .....	58
4-2-6 Modèles d'inflammation sous-rétinienne.....	60
4-2-6-1 Modèle de souris <i>Abca4<sup>-/-</sup> Rdh8<sup>-/-</sup></i> .....	60
4-2-6-2 Modèle de souris immunisées par du carboxyethylpyrrole (CEP) .....	60
4-2-6-3 Modèle de souris <i>Ccr2<sup>-/-</sup>, Ccl2<sup>-/-</sup>, Ccl2<sup>-/-</sup> Cx3cr1<sup>-/-</sup> (Crb1<sup>rd8/rd8</sup>)</i> .....	61
4-2-6-4 Modèle de souris <i>Cx3cr1<sup>-/-</sup></i> .....	62
<b>V- P2RX7, Inflammasome NLRP3 et IL-1<math>\beta</math> .....</b>	<b>64</b>
<b>5-1 Le récepteur P2X7 .....</b>	<b>64</b>
5-1-1 Généralités.....	64
5-1-2 Le récepteur P2X7 (P2RX7) .....	65
5-1-3 Fonctions .....	66
5-1-4 Implication du P2RX7 dans les pathologies neuro-dégénératives.....	67
<b>5-2 Inflammasome NLRP3 .....</b>	<b>69</b>
5-2-1 Structure NLRP3.....	69
5-2-2 L'activation .....	70
5-2-3 Régulation de l'inflammasome NLRP3 .....	73

5-2-4 Inflamasome NLRP3 et pathologies rétiniennes .....	73
<b>5-3 Interleukine-1 .....</b>	<b>73</b>
5-3-1 IL-1 $\alpha$ .....	74
5-3-2 IL-1Ra .....	74
5-3-3 IL-1 $\beta$ .....	75
5-4-3-1 Synthèse .....	75
5-4-3-2 Sécrétion.....	76
5-4-3-3 Implication de l'IL-1 $\beta$ dans la neuro-dégénérescence .....	53
5-3-4 Les récepteurs de l'IL-1 .....	54
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>80</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>83</b>
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>89</b>
<b>I- Rôle du modèle d'inflammation sous-rétinienne dans la DMLA .....</b>	<b>90</b>
1-1 Observations humaines .....	90
1-2 Modèle de souris déficientes en <i>Cx3cr1</i> .....	90
1-3 Origine des PM impliqués dans la mort des PR (axe CCL2/CCR2) .....	91
1-4 Mécanisme de survie .....	92
1-5 Modèle d'analyse <i>ex vivo</i> .....	92
<b>II- Mécanismes impliqués dans la mort des photorécepteurs .....</b>	<b>93</b>
2-1 IL-1 $\beta$ .....	93
2-2 ATP direct/indirect.....	94
2-3 Maintien du phénotype pro-inflammatoire.....	96
2-4 Autres voies .....	96
<b>III- Thérapies.....</b>	<b>97</b>
3-1 Les anti-P2RX7 .....	97
3.2 Pannexines.....	98
3.3 Les anti-IL1 dans les autres pathologies dont test behçet .....	99
3.4 Anti-IL-1 + anti-IL-6 ou anti-CD14 .....	100
<b>IV- Perspectives générales: les autres modèles.....</b>	<b>101</b>
4-1 CCR1/CCR5.....	102
4-2 ApoE .....	102
4-3 Humain.....	103
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>104</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>131</b>

# Liste des abréviations

ApoE: Apolipoprotéine E

AREDS: Age-related eye disease study

ASC: Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD

ATP: Adenosine-5'-triphosphates

BBG: Brilliant blue G

BHR: Barrière hémato-rétinienne

CB: Cellules Bipolaires

CCG: Couche des cellules ganglionnaires

CEP: Carboxyethylpyrrole

CFH: Complement factor H

CH: Cellules horizontales

CM: cellules microgliales

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

CMP: Granulocyte-monocyte progenitor

CNE: Couche nucléaire externe

CNI: Couche nucléaire interne

CPE: Couche plexiforme externe

CPI: Couche plexiforme interne

DMLA: Dégénérescence maculaire liée à l'âge

EPR: Epithélium pigmentaire rétinien

GA: Geographic Atrophy

GMP: Granulocyte-monocyte progenitor

GMPc: Guanosine monophosphate cyclique

HSC: Hematopoietic stem cell

IL-1 $\alpha$ : Interleukin-1 $\alpha$

IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$

IL-1Ra: Interleukin-1 receptor antagonist

IL-1RAcP: Interleukin-1 receptor accessory protein

IL-1R1: Interleukin-1 receptor 1

IL-1R2: Interleukin-1 receptor 2

IL-6: Interleukin-6

LPS: Lipopolysaccharides

M $\phi$ : Macrophages

MB: Membrane de Bruch

MDP: Monocyte-dendritic-cell progenitor  
MLA: Maculopathie liée à l'âge  
Mo: Monocytes  
Mp: Macrophage  
NF- $\kappa$ B: Nuclear factor-  $\kappa$ B  
NO: Nerf optique  
PAMP: Pathogen associated molecular patterns  
PDE: Phosphodiesterase  
PM: phagocytes mononucléés  
PR: Photorécepteurs  
P2RX7: Récepteur P2X7  
RdCVF: Rod-derived cone viability factor  
ROS: Espèce réactives d'oxygène  
SE: Segment externe  
SNC: Système nerveux central  
SI: Segment interne  
SNP: Single nucleotide polymorphism  
TGF $\beta$ : Transforming growth factor  $\beta$   
TIR: Toll IL-1 receptor  
TLR: Toll like receptor  
TNF $\alpha$ : Tumor necrosis factor  $\alpha$   
TSP-1: Thrombospondine 1  
VEGF: Vascular endothelial growth factor

# **INTRODUCTION**

# I- Anatomie et fonction de l'œil

L'œil est l'organe sensoriel spécialisé dans la détection, la localisation et l'analyse de la lumière. De par son origine embryonnaire (organe dérivant du tube neural), l'œil fait partie du système nerveux central (SNC) (Purves, 2001). Il permet aux êtres vivants de traiter l'information lumineuse en signal électrique qui est ensuite transmis vers le cerveau.

L'œil est divisé morphologiquement en deux parties: un segment antérieur et un segment postérieur. Dans cette partie, l'œil sera décrit suivant l'axe antéro-postérieur.

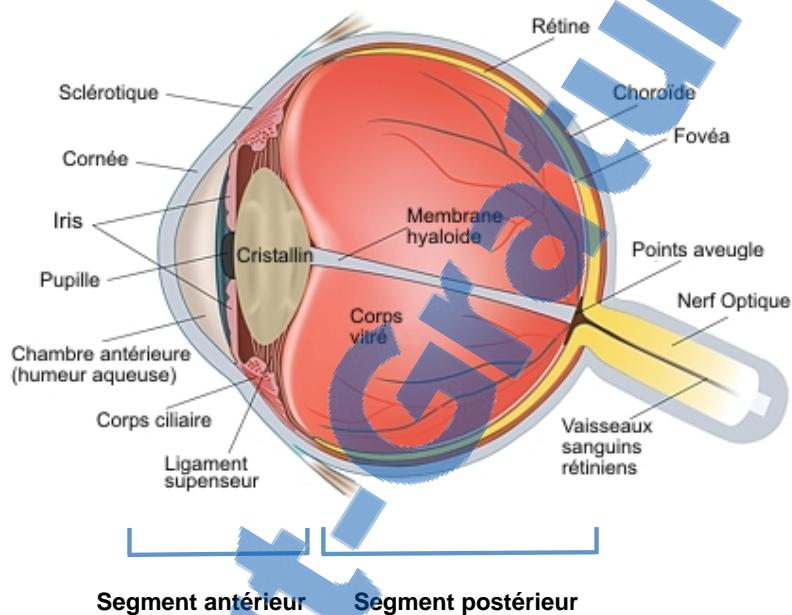


Figure 1: Anatomie de l'œil humain en coupe sagittale.  
(<http://focuseyecalgary.com>)

## 1-1 Le segment antérieur

Il est la partie la plus en avant de l'œil, comprenant tous les tissus situés entre la cornée et la face postérieure du cristallin (Figure.1).

La cornée est la première structure traversée par la lumière et constitue la barrière entre l'environnement extérieur et intérieur de l'œil. Par ailleurs, elle participe au maintien du globe oculaire et à la protection des tissus contenus dans l'œil. La cornée est une lame de tissu conjonctif dense, transparente, avasculaire et fortement innervée (riche en fibres nerveuses nociceptives) (Zander and Weddell, 1951).

En dehors de son rôle protecteur, elle joue également un rôle majeur dans la réfraction de l'œil, participant ainsi pour 70 % au pouvoir réfractif oculaire.

La chambre antérieure qui est située entre la cornée et l'iris est infiltré par un liquide transparent, l'humeur aqueuse. Ce liquide est composé essentiellement à plus de 99% d'eau, de vitamine C, d'acide lactique, de glucose et d'une faible concentration en protéines (De Berardinis et al., 1965). Le rôle premier de l'humeur aqueuse est d'apporter les nutriments nécessaires à la cornée et au cristallin. Elle permet aussi de maintenir la forme de l'œil ainsi que de maintenir la pression intraoculaire par un renouvellement constant de l'humeur aqueuse grâce aux procès ciliaires. Cependant, un défaut de sa réabsorption au niveau du canal de Schlemm peut entraîner une augmentation de la pression intraoculaire pouvant conduire à un glaucome (McLaren, 2009).

Ensuite vient l'iris qui est une membrane circulaire et contractile, qui se trouve dans l'humeur aqueuse entre la cornée et le cristallin. Il s'agit d'une structure pigmentée conférant à l'œil sa couleur. Ce dernier est perforé en son centre, formant la pupille. La contraction ou la dilatation de l'iris permet de contrôler le degré d'illumination de la rétine par l'intermédiaire de deux muscles antagonistes: le sphincter et le dilatateur.

Le cristallin est une capsule mince et élastique qui est responsable de la projection fine de l'image sur la rétine. Il joue le rôle d'une lentille biconvexe dont le but est de focaliser les rayons lumineux sur la rétine. Il est composé de fibres cellulaires riches en cristallines. L'opacification du cristallin conduit à une cataracte qui constitue la première cause de cécité dans le monde (Javitt et al., 1996).

## 1-2 Le segment postérieur

Il est délimité en avant par la capsule postérieure du cristallin et en arrière par la sclère. Le vitré (ou humeur vitré), qui occupe 90 % du volume de l'œil humain, est un gel transparent, visqueux composé à 98 % d'eau, d'acide hyaluronique, de collagènes, de glycosaminoglycans et d'acides aminés (Durham, 1970). Ce gel est contenu dans une enveloppe transparente, la membrane hyaloïde. Par ailleurs, le vitré se fixe au niveau du cristallin et de la rétine ce qui permet de maintenir la forme de l'œil en absorbant les chocs et de garder la rétine collée contre la paroi postérieure de l'œil.

La rétine est formée de la rétine neurale (siège de la phototransduction) et de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) (cette partie sera détaillée ci-dessous).

La membrane de Bruch (MB) est une couche acellulaire située entre l'EPR et la choriocapillaire, qui est constitué d'une couche centrale d'élastine bordée de chaque coté par une zone riche en collagène. Cette membrane est le lieu d'échanges métaboliques très importants depuis la choroïde qui est la couche collée à la MB dans sa partie externe, et qui

est une source de nutriments et d'oxygène vers la rétine externe et l'épithélium pigmentaire qui ont une activité métabolique intense.

Et enfin, la sclère, la plus externe, est la membrane conjonctive qui protège l'œil et qui permet le maintien de la forme oculaire. Le nerf optique regroupe la totalité des axones des cellules ganglionnaires de l'œil vers le tectum puis vers cortex visuel. La papille aussi appelée tache aveugle est la région d'émergence du nerf optique dans la rétine. Elle est dépourvue de photorécepteurs et ne peut donc capter aucun stimulus lumineux.

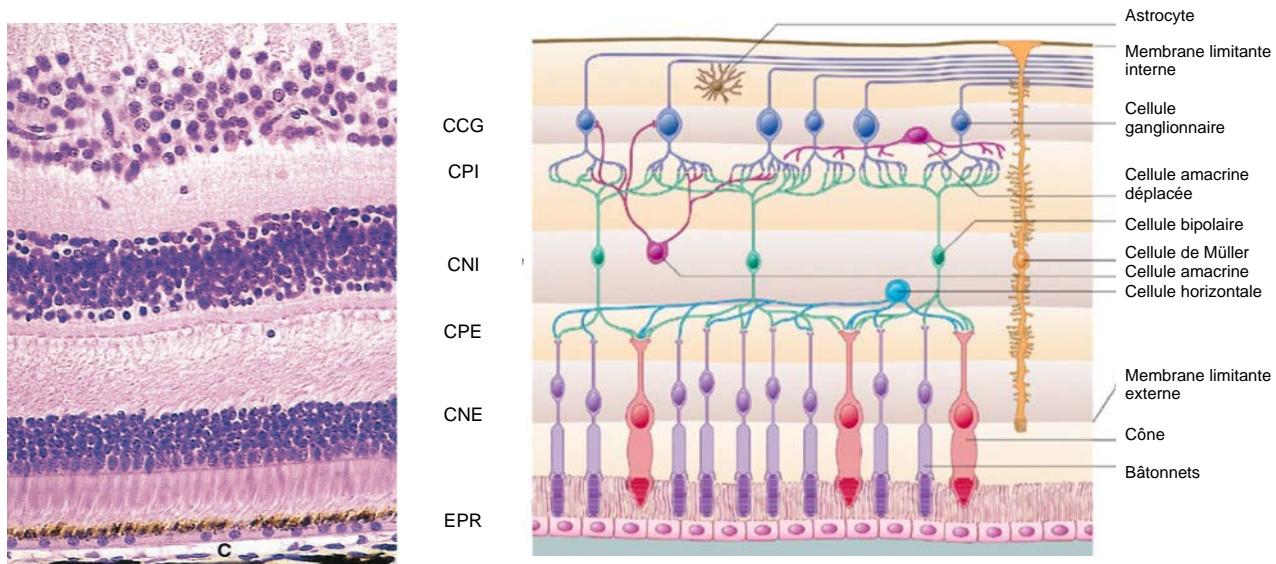


Figure 2: Anatomie de la rétine.

Coupe histologique d'une rétine humaine et schéma représentant les cellules de la rétine.

CCG: Couche des cellules ganglionnaires; CPI: Couche plexiforme interne; CNI: Couche nucléaire interne; CPE: Couche plexiforme externe; CNE: Couche nucléaire externe; EPR: épithélium pigmentaire rétinien.

(d'après Junqueir's basic histology altlas; Gray's anatomy)

### 1-2-1 La rétine neurale

La rétine neurale est composée à 95 % de cellules neurales et gliales et à 5 % de vaisseaux (Figure. 2). Elle tapisse la partie interne de l'œil et est fixée au niveau de l'ora serrata (partie postérieure des corps ciliaires) et au niveau du nerf optique. La lumière qui pénètre dans l'œil traverse toute la couche de la rétine interne avant d'atteindre la couche nucléaire externe (CNE) (la partie la plus externe de la rétine neurale) qui est le siège de la phototransduction.

Les photorécepteurs (PR) dont il en existe deux types: les cônes et les bâtonnets, constituent la CNE. Ils sont responsables de la transduction du stimulus lumineux en un signal nerveux. L'information électrique est ensuite transmise aux cellules bipolaires (CB). La transmission de cet influx à travers la rétine est modulée par les cellules horizontales et les cellules amacrines. Les noyaux des cellules bipolaires, horizontales et amacrines participent à la couche nucléaire interne (CNI). Et enfin l'information est transmise à la couche des cellules ganglionnaires (CCG), dont les axones se regroupent pour former le nerf optique (NO).

Entre ces couches cellulaires, se trouvent deux couches acellulaires, la couche plexiforme externe (CPE) et la couche plexiforme interne (CPI). Elles contiennent les capillaires sanguins irrigant la rétine interne. La CPE se trouve entre la CNE et la CNI qui est composée des synapses et fibres que les CB forment avec les cellules horizontales (CH) et les PR. La CPI est située entre la CCG et la CNI qui est composée de toutes les synapses et fibres que les CB forment avec les cellules amacrines et les cellules ganglionnaires.

### 1-2-1-1 Photorécepteurs

Bien que ces deux types de PR se distinguent par la forme de leurs segments externes (SE) (conique pour les cônes et cylindrique pour les bâtonnets), ils ont néanmoins une structure similaire (Figure. 3).

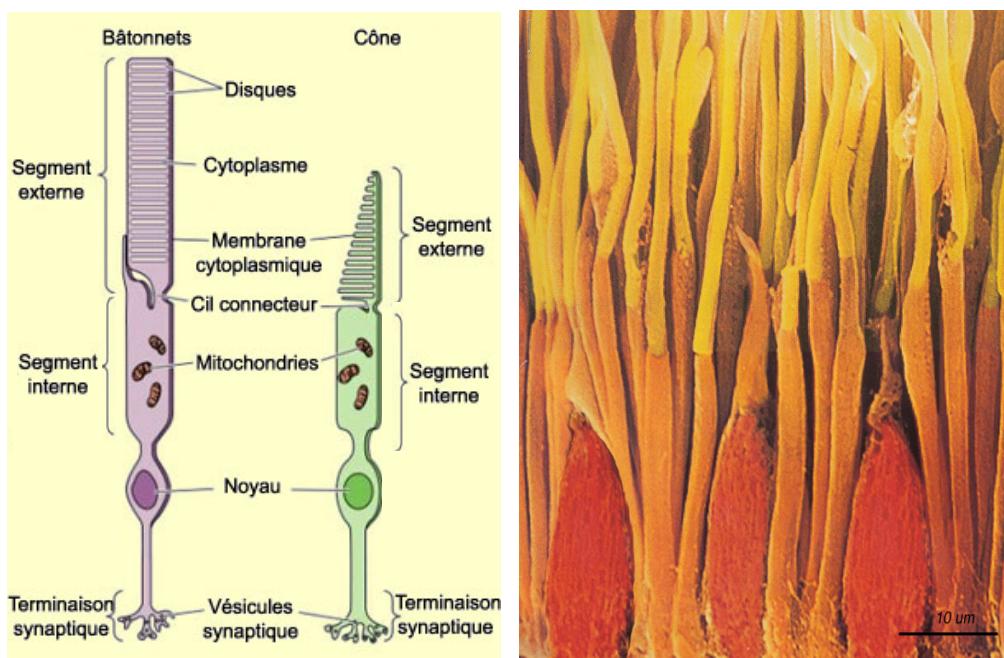


Figure 3: Structure de PR à cônes et à bâtonnets.  
Schéma de PR (à gauche) et image confocale des PR (à droite).  
(Purves, 2004 et Helga kolb photoreceptors)

Ils possèdent tous les deux une partie distale, le SE, adjacent à l'épithélium pigmentaire et qui contient toute la machinerie de phototransduction et des photopigments qui absorbent la lumière et génèrent des modifications de potentiel de membrane des PR. Ce segment est continuellement renouvelé grâce à un équilibre entre la phagocytose (par l'EPR) et la croissance (au niveau du cil connecteur). Ce cil connecteur relie le SE au segment interne (SI). Dans le SI, on retrouve les organites (mitochondries qui sont indispensables à la production d'énergie par la synthèse d'adénosine triphosphates (ATP), l'appareil de golgi et le réticulum endoplasmique). Les noyaux des PR confèrent son épaisseur à la CNE et l'extrémité interne des PR donne naissance aux prolongements synaptiques qui s'articulent avec les CB ou les CH.

#### 1-2-1-1-1 Bâtonnets

L'homme possède 120 millions de bâtonnets (Shichi, 1999) qui sont sensibles aux basses intensités lumineuses. Les bâtonnets présentent un long SE cylindrique avec de nombreux disques (empilement de 700 à 1100 disques) enchâssés dans le cytoplasme de la cellule, les rendant sensibles à la lumière (Figure. 3). Ils sont responsables de la vision nocturne, périphérique et des formes (vision scotopique).

#### 1-2-1-1-2 Cônes

Les cônes représentent 5 à 10% (environ 6,5 millions) (Shichi, 1999) des cellules photoréceptrices. Dans le cas des cônes, les disques des cônes sont formés par le repliement de la membrane plasmique et ont un SE plus court que les bâtonnets (Figure. 3). Ils sont responsables de la vision diurne et de la vision des couleurs (vision photopique).

#### 1-2-1-1-3 Phototransduction

La phototransduction est l'ensemble des réactions aboutissant à la transformation du signal lumineux en signal électrique par les PR grâce aux photopigments contenus dans les disques de leurs SE. Les photopigments des PR sont constitués par l'association d'une opsine, protéine à 7 domaines transmembranaires et d'un chromophore, le *11-cis-retinal* (qui est un dérivé de la vitamine A). A l'obscurité, les PR sont maintenus en constante dépolarisation (- 40 mV) par l'ouverture des canaux cationiques (sodiques et calciques) qui sont dépendants de la concentration intracellulaire de GMPc (se lient aux canaux cationiques membranaires des SE et les maintiennent ouverts). Cet état de dépolarisation

induit une libération permanente de neurotransmetteur (le glutamate) au niveau des terminaisons synaptiques avec les CB (Purves, 2001).

Les bâtonnets sont des récepteurs monochromatiques qui ne contiennent qu'un seul type de pigment visuel: la rhodopsine, qui présente un pic de sensibilité des photons à une longueur d'onde de 496 nm. Les cônes possèdent des pigments sensibles à des longueurs d'onde différentes permettant la vision des couleurs. Ainsi chez l'homme, les cônes bleus ou S (10% des cônes) sont principalement activés par une longueur d'onde vers 420 nm, les cônes verts ou M (30% des cônes) autour de 530 nm et les cônes rouges ou L (60% des cônes) vers 560 nm. Cette disposition est appelée vision trichromatique.

Lorsqu'un photon arrive au niveau des PR, cela induit l'isomérisation du *11-cis-retinal* en *tout-trans* retinal. Cette dernière permet l'activation d'une protéine appartenant à la famille des protéines G, la transducine, qui à son tour va activer une phosphodiésterase (PDE) associée à la membrane. Cette PDE va ensuite hydrolyser le GMPc (qui s'accumule en absence de lumière), ce qui entraîne une fermeture des canaux cationiques situés au niveau des SE. La fermeture de ces canaux mène à une hyperpolarisation membranaire des PR et à l'arrêt de libération du glutamate au niveau des synapses (Figure. 4).

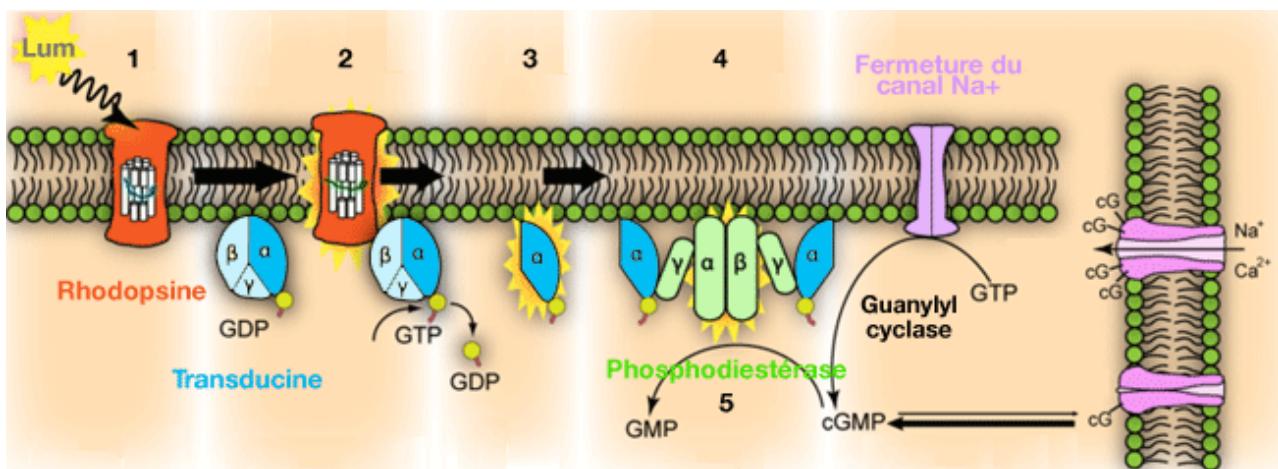


Figure 4: La phototransduction.

Schéma représentatif du mécanisme de phototransduction ayant lieu dans les segments externes des photorécepteurs.  
(modifié à partir de Leskov et al, 2000)

#### 1-2-1-1-4 Différences régionales dans la rétine

Un des points essentiels concernant la physiologie de la vision repose sur la distribution des PR dans la rétine (Figure. 5). En effet, les bâtonnets sont majoritairement présents au niveau de la périphérie de la rétine alors que les cônes sont principalement situés dans la macula (Figure. 5A). La rétine de l'homme possède une macula (environ 2 mm de diamètre) qui est située au centre de la rétine dans l'axe optique, proche du nerf optique et qui est responsable de la vision fine. Au centre de la macula se trouve la fovéa (de 1 mm<sup>2</sup>) (Figure. 5B).

Elle est caractérisée par la présence d'une petite dépression au milieu, la fovéa centralis (ou foveola) constituée exclusivement de cônes (150 000 mm<sup>2</sup>) (Jonas et al., 1992) qui est le point focal postérieur du système optique avec la meilleure acuité visuelle (Figure. 5B).

Au niveau de la fovéa, il existe une différence de convergence des signaux émanant des PR. La convergence moyenne en périphérie est de 60 bâtonnets sur une même cellule ganglionnaire, ce qui résulte en une plus grande sensibilité à la lumière. Alors qu'au niveau de la foveola, le nombre de cellules ganglionnaires est quasiment similaire au nombre de cônes, ce qui augmente fortement le nombre d'informations détaillées reçues par le cerveau et améliore la résolution de l'image qui s'y forme. De plus, les vaisseaux sanguins et les couches internes de la rétine (CCG, CNI) sont décalés vers la périphérie pour éviter la perte de l'acuité visuelle liée à la traversée de ces couches. Ainsi les rayons lumineux atteignent directement les cônes (Figure. 5C).

#### 1-2-1-2 Les cellules bipolaires

Les CB sont principalement impliquées dans la transmission du signal provenant des PR vers les CG et sont classées en fonction du type de PR avec lesquelles elles sont en contact (Figure. 2 et 6). Une diminution de concentration de glutamate au niveau synaptique induit des modifications de réponse des CB. En effet, les CB ON (normalement hyperpolarisées à l'obscurité) se dépolarisent et libèrent du glutamate tandis que les CB OFF (normalement dépolarisées à l'obscurité) s'hyperpolarisent et diminuent la quantité de glutamate libérée. Au niveau de la fovea, chaque CB forme une synapse avec un seul cône (connexion directe) alors qu'au niveau de la rétine périphérique, chaque CB peut recevoir des informations provenant de plus de 70 bâtonnets. De plus, en périphérie, les PR communiquent indirectement avec les CB via les CH (connexion indirecte).

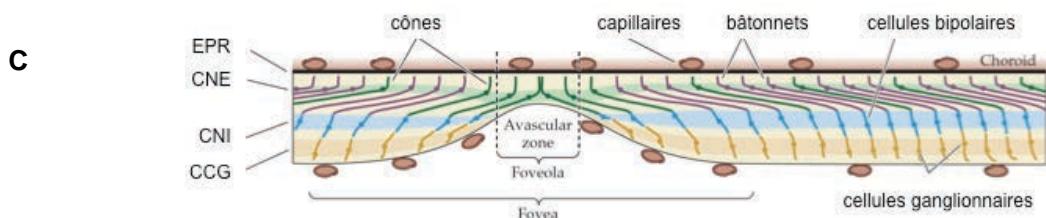
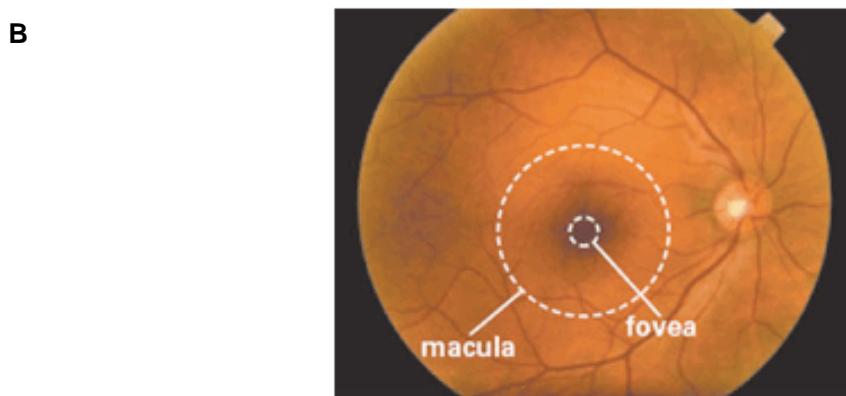
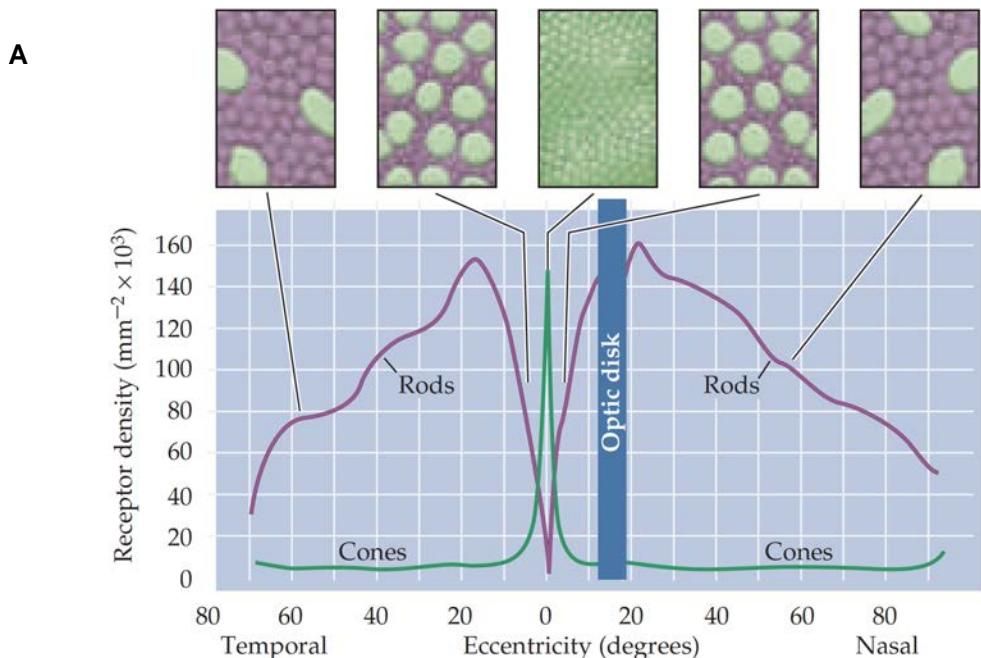


Figure 5: Distribution des cônes et des bâtonnets dans la rétine humaine.

A) Graphique représentatif de la distribution spatiale des cônes et des bâtonnets dans la rétine.

B) Fondoscopie montrant la fovea et la macula.

C) Schéma représentant les cellules présentes dans la fovea. CCG: Couche des cellules ganglionnaires; CNI: Couche nucléaire interne; CNE: Couche nucléaire externe; EPR: épithélium pigmentaire rétinien.

(Purves, 2004 et <http://visionassociatesofprospect.com/macular-degeneration.html>)

### 1-2-1-3 Les cellules horizontales

Les CH permettent de moduler l'information transmise et sont connectées latéralement à plusieurs PR et CB. Leur rôle est d'inhiber l'activité des cellules avoisinantes par la libération de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) (Yang, 2004). Cette suppression sélective de certains signaux nerveux s'appelle l'inhibition latérale et son rôle général est d'augmenter l'acuité d'un signal sensoriel.

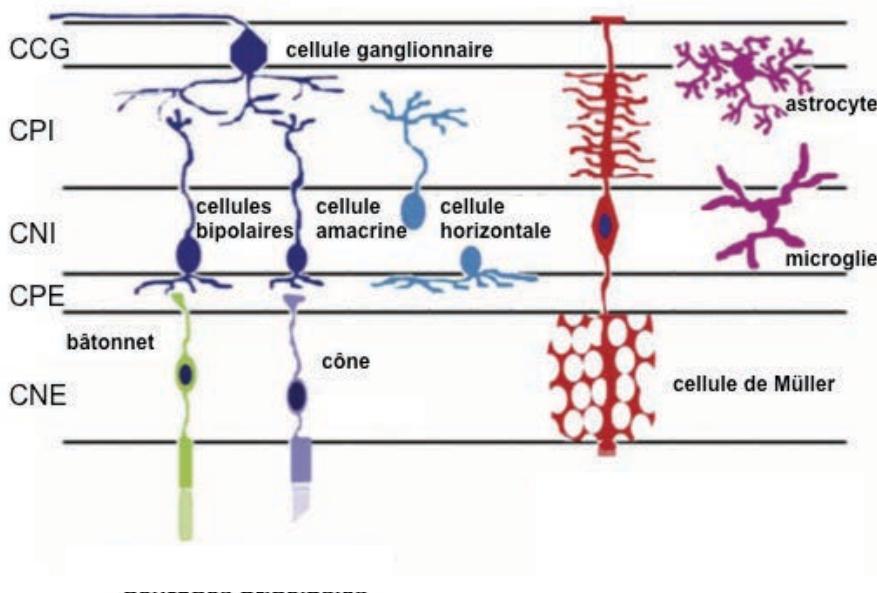


Figure 6: Les différentes cellules de la rétine.

CCG: Couche des cellules ganglionnaires; CPI: Couche plexiforme interne;

CNI: Couche nucléaire interne; CPE: Couche plexiforme externe; CNE:

Couche nucléaire externe.

(modifié à partir de West, 2009)

### 1-2-1-4 Les cellules amacrines

Les cellules amacrines permettent de moduler l'information dans la CPI entre les CB et les CG (Figure. 2 et 6). La majorité des cellules amacrines sont situées dans la CNI, mais une population d'amacrines appelée amacrines déplacées réside dans la CCG.

Plus de 20 cellules amacrines différentes ont été identifiées, elles ne possèdent pas d'axone et sont des neurones principalement de type glycinergiques ou GABAergiques (Wassle et al., 2009).

### 1-2-1-5 Les cellules ganglionnaires

Les CG collectent les informations visuelles qui ont traversé l'ensemble de la rétine, et les transmettent au cerveau par le NO.

Ces cellules sont organisées en plusieurs couches chez l'humain au niveau de la macula mais forment seulement une seule couche chez les souris.

Elles sont les premiers neurones à générer un PA au sein de la rétine. En effet, dans les autres cellules de la rétine, la stimulation provoque des variations graduelles du potentiel de membrane.

La réponse des CG est complémentaire de celle des CB. A l'obscurité, les CG émettent spontanément des potentiels d'action. Ainsi, la fréquence d'émission des potentiels d'action augmente lorsque les CB répondent par une augmentation de libération de glutamate. Le NO sort de l'œil et conduit le signal nerveux jusqu'aux corps genouillés latéraux, en direction du cortex visuel.

### 1-2-1-6 Les cellules gliales

Les cellules gliales de la rétine sont les cellules de Müller, les astrocytes et les cellules microgliales (CM) (Kolb, 1995). Les cellules de Müller et les astrocytes participent au maintien de l'homéostasie de la rétine tandis que les microglies sont des cellules immunitaires, les macrophages résidents du SNC.

#### 1-2-1-6-1 Les astrocytes

Les astrocytes sont principalement situés dans la CCG et sont en contact avec les vaisseaux sanguins et les CG grâce à leurs longs prolongements cytoplasmiques, et ont principalement un rôle de soutien et de maintien des structures rétinien (Figure. 6) (Kimelberg and Nedergaard, 2010). Ces cellules participent notamment à la mise en place de la barrière hémato-rétinien. En effet, le recouvrement des vaisseaux rétiniens par les prolongements des astrocytes limite les échanges entre la circulation sanguine et la rétine. Ils participent notamment à la gliose, phénomène de cicatrisation des lésions et interviennent aussi au niveau des synapses pour capturer les neurotransmetteurs. Ils peuvent moduler le signal au cours de la vision, par leurs contacts au niveau des régions synaptiques en agissant sur la dispersion et la recapture des neurotransmetteurs (Kimelberg, 2010).

#### 1-2-1-6-2 Les cellules gliales de Müller

Les cellules gliales de Müller, du fait de leur disposition radiale de part et d'autre de la rétine neurale, jouent un rôle de soutien structural pour le maintien de la rétine (Figure. 2 et 6) (Bringmann et al., 2006). Elles régulent le taux de neurotransmetteurs au niveau des synapses (en particulier le glutamate) mais également au niveau du métabolisme du glucose (Winkler et al., 2000) et du recyclage des photopigments des cônes.

### 1-2-1-6-3 Les cellules microgliales

Les microglies représentent les principales cellules immunitaires de la rétine en condition non pathologique. Elles sont localisées en condition physiologique dans la rétine interne (CCG, CNI, CPI et CPE) (Figure. 6 et 7) (Karlstetter et al., 2015) (Santiago et al., 2014). En condition physiologique, les CM sont des cellules ramifiées, étoilées et sondent en permanence leur environnement grâce à leurs multiples prolongements cytoplasmiques. Cette partie sera détaillée dans le chapitre 3-2-3.

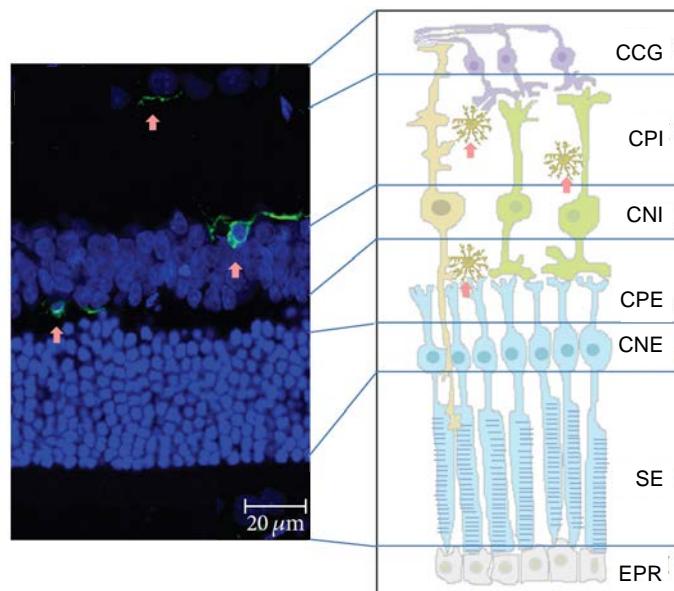


Figure 7: Localisation des cellules microgliales dans la rétine.

CCG: Couche des cellules ganglionnaires; CPI: Couche plexiforme interne; CNI: Couche nucléaire interne; CPE: Couche plexiforme externe; CNE: Couche nucléaire externe; SE: Segments externes  
(adapté de Santiago, hindawi, 2014)

## 1-2-2 L'épithélium pigmentaire rétinien

### 1-2-2-1 Généralités

L'EPR est une monocouche de cellules épithéliales de forme hexagonale, très différenciées (Figure. 8). Les cellules qui le constituent s'étendent du NO à la périphérie jusqu'à l'ora serrata couvrant ainsi toute la surface de la neurorétine.

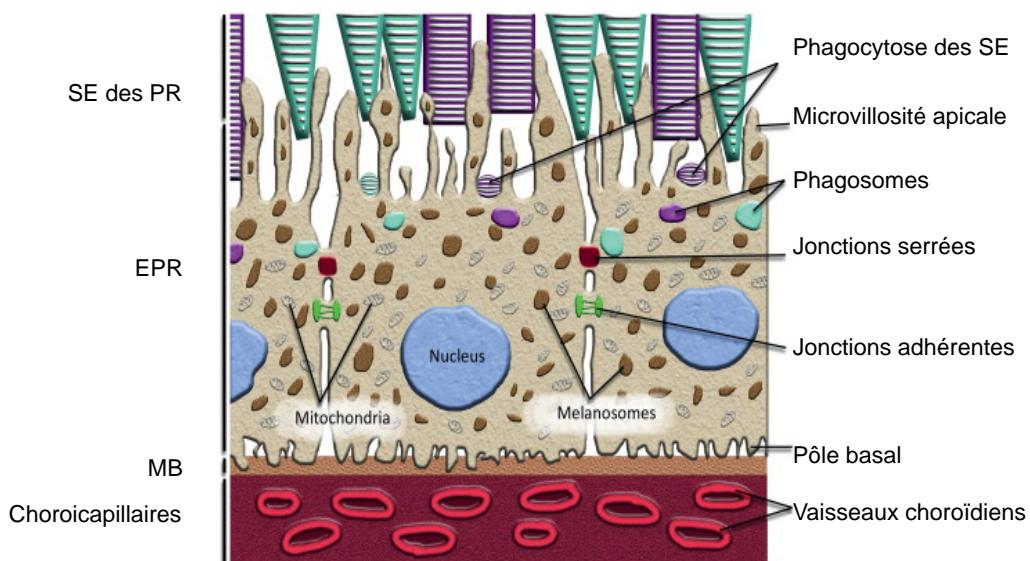


Figure 8: L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR)

SE: Segments externes; PR: Photorécepteurs; EPR: épithélium pigmentaire rétinien; MB: Membrane de Brück

(Carr, cell press, 2013)

L'EPR humain est constitué de 4 à 6 millions de cellules, d'une épaisseur de 10 à 20 µm, les cellules peuvent souvent être binucléées (Forrester, 2002) et comme tout épithélium, les cellules de l'EPR sont jointes par des jonctions serrées (zonulae occludens) et constituent la barrière hémato-rétinienne externe.

Elles sont considérées comme des cellules post-mitotiques. Lorsqu'une cellule meurt, elle est remplacée par hyperplasie de ses cellules voisines, les cellules adjacentes s'étalent et comblient le vide permettant ainsi de maintenir l'étanchéité de la barrière entre la neurorétine et la choroïde. Ce phénomène conduit à une grande variation de la taille et la forme des cellules chez les personnes âgées.

De part la distribution asymétrique de ses organites et de ses protéines membranaires, l'EPR est polarisé (en un domaine apical et basolatéral). Les microvillosités (les

pseudopodes) du pôle apical enveloppent les extrémités des SE des PR, permettant leur phagocytose. Au niveau de leur pôle apical, elles sont jointives grâce à un réseau de microfilaments organisés en zonulae occludens. On retrouve dans cette partie les mélanosomes qui produisent et stockent la mélanine qui donne sa couleur sombre à l'EPR et des granules de lipofusines tandis que dans la partie basale se trouvent le noyau et les mitochondries. La membrane basale forme des circonvolutions reposant sur une lame basale, en contact avec la MB à travers laquelle passent les nutriments et les déchets qui transitent entre l'EPR et la choroïde.

### 1-2-2-2 Fonctions de l'EPR

L'EPR est un élément essentiel au maintien de l'homéostasie générale de la rétine. Il participe à 90 % des apports nécessaires à la survie et au fonctionnement des PR.

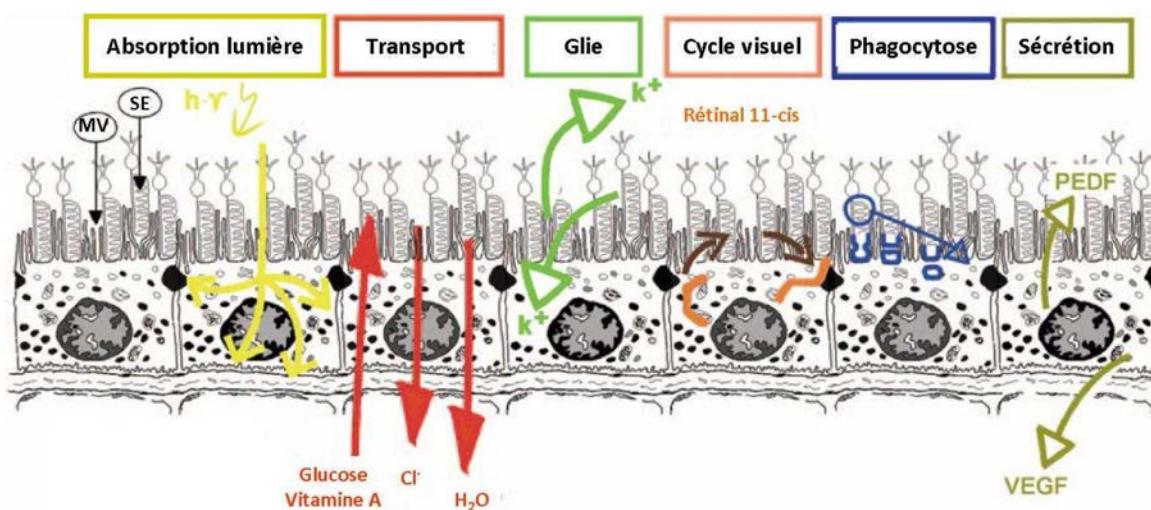


Figure 9: Les différentes fonctions de l'EPR.

MV: Microvillosités; SE: Segment externe.

(adapté à partir de Strauss, physiol rev, 2005)

En effet, il régule le transport des nutriments et de l'O<sub>2</sub> de la choroïde vers les PR et le transport des produits de dégradation métabolique des PR vers la choroïde (Figure. 9).

Les longues extensions membranaires, les pseudopodes sont responsables de la phagocytose des anciens disques au niveau de la partie la plus distale du SE par l'EPR, ce qui est essentiel pour la survie des PR.

Une autre fonction essentielle de l'EPR est le recyclage du pigment visuel. En effet, pour permettre le renouvellement du 11-cis rétinal, le tout-trans rétinal est converti en tout-trans rétinol dans les SE des PR. Le tout-trans rétinol est ensuite capté par les villosités des cellules de l'EPR, et la forme tout-trans est réisomérisée en 11-cis rétinal.

Les pigments de la mélanine de l'EPR permettent de limiter les agressions causées par les radicaux libres produits par la lumière ou engendrés par la phagocytose des SE des PR (Miceli et al., 1994). L'absorption de la lumière par ces pigments permet également d'augmenter l'acuité visuelle en empêchant la réflexion de la lumière vers la rétine, qui créerait des interférences avec la lumière directe au niveau du signal transmis au cerveau.

Une autre fonction essentielle de l'EPR est l'élimination des déchets et l'approvisionnement en nutrition de la CNE (qui n'est pas vascularisée) en jouant le rôle de transporteur épithéial. Ainsi, l'EPR participe aux échanges bidirectionnels entre les PR et les vaisseaux de la choroïde, les nutriments comme le glucose, les acides gras et l'O<sub>2</sub> passent des vaisseaux aux PR et inversement pour les déchets.

### 1-2-3 Les réseaux vasculaires

L'œil est l'un des organes les plus consommateur en O<sub>2</sub> par poids de tissu et nécessite un apport important en nutriments (Wong-Riley, 2010). La rétine est vascularisée par deux systèmes vasculaires indépendants. D'une part, le réseau vasculaire rétinien assure la vascularisation directe des couches rétiennes internes. D'autre part le réseau choroïdien assure la vascularisation de la rétine externe.

#### 1-2-3-1 Le réseau vasculaire rétinien

L'artère centrale de la rétine dérive de l'artère ophtalmique qui elle-même dérive de la carotide interne chez l'homme. L'artère rejoint le NO puis suit le trajet intraneural pour émerger au niveau de la papille où, chez l'homme, elle se subdivise en 4 branches terminales: temporelle, nasale, supérieure et inférieure. Ces artères terminales se divisent alors en collatérales, lesquelles se subdivisent en terminales ainsi de suite jusqu'à former un réseau couvrant pratiquement toute la rétine.

Les vaisseaux rétiens forment deux couches de vaisseaux: une superficielle dans la CCG et une profonde dans la CNI (Figure. 10). La structure cellulaire du réseau vasculaire rétinien

assure le maintien de la barrière hémato-rétinienne. Les cellules endothéliales des capillaires forment des jonctions serrées étanches entourées par une épaisse membrane basale limitant la diffusion passive des grosses molécules. La paroi des capillaires rétiniens est également en contact avec les extensions des astrocytes et les cellules de Müller. Cette gaine gliale joue un rôle de support structural et trophique des cellules vasculaires contribuant à l'intégrité de l'étanchéité. Des péricytes disposent d'une activité contractile et exercent un contrôle local sur le flux sanguin (Chakravarthy and Gardiner, 1999).

La fovéa fait exception de cette organisation puisqu'au niveau de la fovéa, on ne retrouve que la CNE. L'approvisionnement en nutriments et en O<sub>2</sub> se fait donc par le réseau vasculaire choroïdien uniquement.

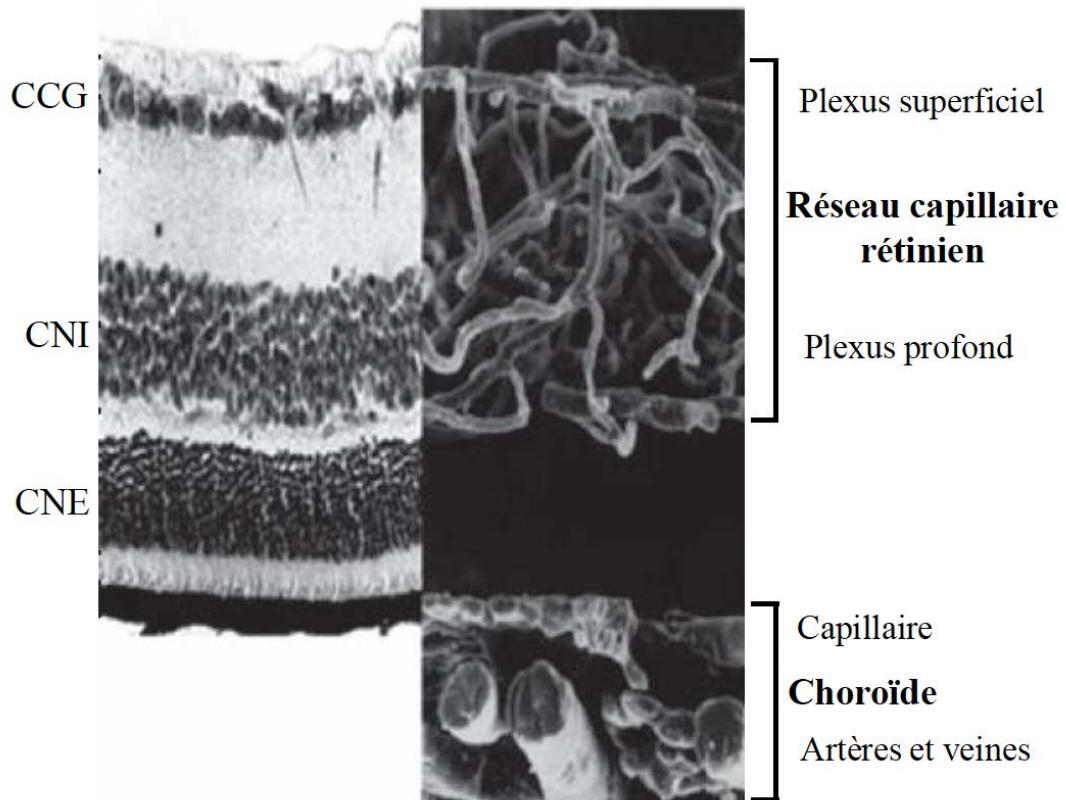


Figure 10: Le réseau vasculaire rétinien.  
Coupe histologique de rétine (à gauche) et moulage vasculaire rétinien (à droite).  
(d'après F. Sennlaub)

### 1-2-3-2 Le système vasculaire choroïdien

La choroïde est limitée en avant par la MB et adhérente à la sclère en arrière. La vascularisation de la choroïde provient des branches courtes et longues de l'artère ciliaire postérieure dont le rôle est d'approvisionner les PR (le dernier 1/3 de la rétine qui ne possède pas de réseau capillaire nourricier) en nutriments et en O<sub>2</sub> (par la choriocapillaire) (Figure. 10). La choriocapillaire présente des fenestrations (Bernstein and Hollenberg, 1965), en regard de la membrane de Bruch, ce qui explique sa perméabilité élevée et le maintien, entre autres, d'une concentration élevée de glucose dans l'EPR, le passage de protéines impliquées dans la formation de la vitamine A et la distribution vers la rétine (Bill et al., 1980). Le débit choroïdien est estimé à 800 ml/min, qui est l'un des plus importants de l'organisme. Bien que le réseau capillaire rétinien et le système vasculaire choroïdien soient bien dissociés dans l'espace, ils sont complémentaires dans leur fonction.

## II- DMLA

### 2-1 Généralités

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de cécité légale irréversible dans les pays industrialisés chez les personnes âgées de plus de 50 ans (Friedman et al., 2004); (Klein et al., 2007). Il s'agit d'une pathologie neuro-dégénérative qui touche spécifiquement la rétine centrale au niveau de la macula. La prévalence augmente exponentiellement avec l'âge (Klein et al., 1997).

La DMLA est une maladie complexe, multifactorielle associée à des facteurs environnementaux et génétiques même si l'âge avancé demeure le facteur le plus important. Cette pathologie évolue progressivement pendant plusieurs années avant que les premiers symptômes apparaissent. Les patients ne sont souvent dépistés qu'à un stade avancé, ou lorsque la perte visuelle est déjà irréversible. L'identification des facteurs et une meilleure compréhension des mécanismes responsables du basculement entre MLA et DMLA permettraient d'apporter un traitement avant l'apparition de lésions irréversibles.

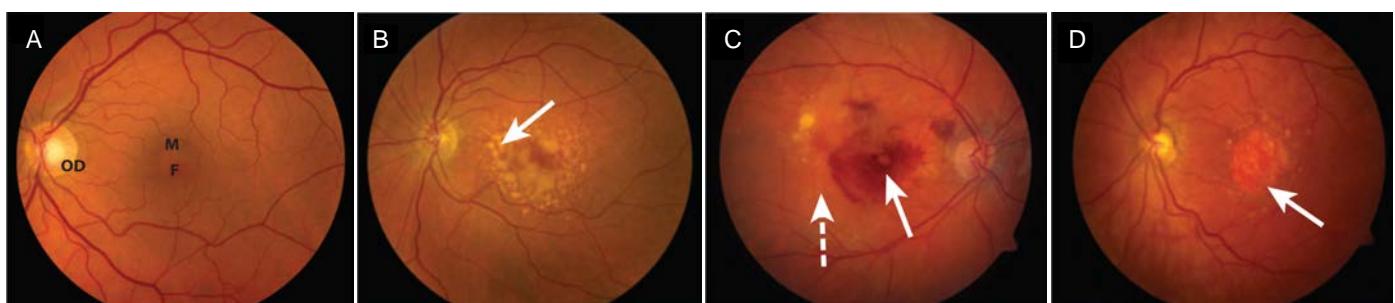


Figure 11: Fonds d'œil des différents stades de la DMLA.

A) Sujet sain. OD: papille optique; M: macula; F: fovéa.

B) Patient atteint de MLA avec des drusen soft (flèche).

C) Patient atteint de DMLA néovasculaire avec une hémorragie sous-rétinienne (flèche pleine), des exsudats (flèche discontinue) et des drusen soft.

D) Patient atteint de DMLA atrophique avec une dégénérescence des PR, de l'EPR et du choriocapillaire dans la zone atrophique (flèche).

(Swaroop, Annu Rev Genomics Hum Genet, 2009)

La forme précoce de la maladie appelée Maculopathie liée à l'âge (MLA) est caractérisée par la présence de dépôts blanchâtres, les drusen softs (ou larges drusen), situés entre l'EPR et la MB et des anomalies de pigmentation de l'EPR (Figure. 11B). Les premiers symptômes

peuvent être l'augmentation du besoin de la lumière lors de la lecture, une baisse de la perception des contrastes et l'apparition de métamorphopsies qui sont des déformations de l'image perçue (déformation des lignes droites qui paraissent tordues) (Figure. 12A) (Soubrane, 2007). Un grand nombre de patients qui présente une MLA vont évoluer vers une forme plus avancée de la maladie, la DMLA. Elle se manifeste par une baisse de l'acuité visuelle, une vision déformée (métamorphopsies) et l'apparition d'une tâche centrale (scotome) (Figure. 12B) causée par une perte des PR au niveau de la macula. On distingue deux formes avancées: la forme humide, néovasculaire ou encore exsudative présentant des néovascularisations choroïdiennes (Figure. 11C et 13C) et la forme sèche ou atrophique caractérisée par une dégénérescence progressive de l'EPR et des PR au niveau de la macula (Figure. 11D et 13D). Cette pathologie affecte grandement la qualité de vie et limite les activités quotidiennes comme la lecture ou la conduite.

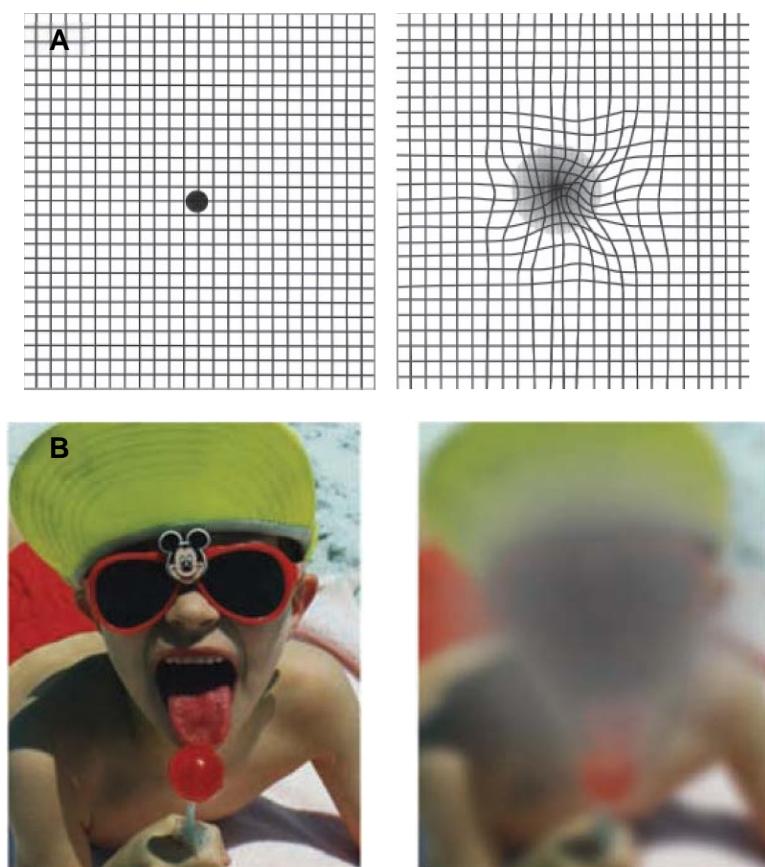


Figure 12: Vision évolutive d'un patient atteint de DMLA.

A) Grille d'Amsler permettant de détecter une métamorphopsie.

B) Représentation de la perte de la vision centrale (droite) chez les patients atteints d'une DMLA avancée.

(Chen, JCI, 2007)

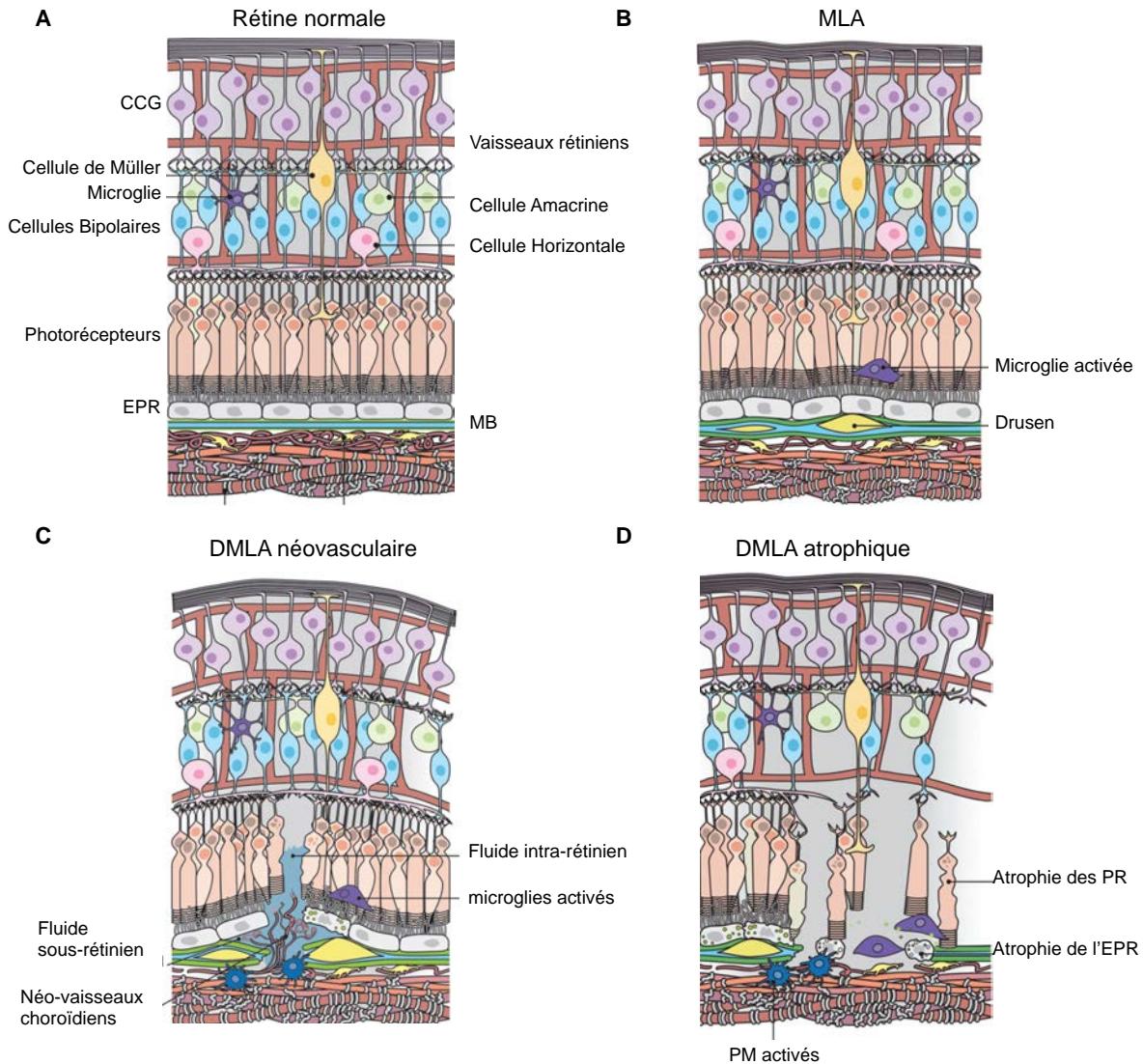


Figure 13: Représentation schématique des différentes formes de la DMLA.

A) Rétine saine.

B) Rétine représentant une MLA. Accumulation de drusen, une altération de l'EPR et une accumulation de PM dans l'espace sous-rétinien.

C) Rétine représentant une DMLA néovasculaire. Altération de la MB par la présence de néovaisseaux choroïdiens, exsudats sous-rétiniens qui s'accumulent dans l'espace sous-rétinien et accumulation de PM dans l'espace sous-rétinien. CNV: néovaisseaux choroïdiens.

D) Rétine représentant une DMLA atrophique. Dégénérescence des PR et de l'EPR, altération de la MB et accumulation importante de PM dans les zones atrophiques.

PM: Phagocytes mononucléés.

(Adapté de Van Lookeren Campagne, J pathol, 2014)

## 2-2 Epidémiologie

Aux Etats-Unis, la forme précoce (MLA) affecte environ 7 % des personnes âgées de moins de 55 ans jusqu'à atteindre 25 % chez les personnes de plus de 75 ans (Friedman et al., 2004).

Pour les stades avancés (la forme humide et atrophique), la prévalence est de moins de 0,5 % chez les personnes de moins de 55 ans et atteint jusqu'à 8 % chez les personnes de plus de 75 ans (Friedman et al., 2004).

30 % des patients atteints d'une MLA vont évoluer vers une forme avancée de la DMLA dont 55% vers la forme néovasculaire et 45 % vers la forme atrophique. La présence d'une MLA à un ou deux yeux n'entraîne pas forcément une DMLA même si le risque est fortement augmenté par rapport aux sujets sains (Klein et al., 2002).

## 2-3 MLA

Les premiers signes de la MLA apparaissent habituellement aux alentours de 50 ans. Le risque de développer une MLA augmente grandement avec l'âge. Les signes cliniques de la MLA comportent classiquement les altérations de l'EPR (hyper ou hypopigmentation), l'apparition des drusen soft (Figure. 11B) (Neelam et al., 2009) et l'accumulation de lipofusine (Strauss, 2005). Ces lésions n'ont généralement que peu d'effets sur la vision centrale et leur présence n'induit pas systématiquement l'apparition d'une DMLA.

Une hyperpigmentation ou une hypopigmentation de l'EPR résulte d'une augmentation ou d'une diminution de la production de la mélanine. Il a été démontré que la concentration en lipofusine était corrélée avec la teneur en mélanine. De plus ces plages d'hypopigmentation peuvent évoluer vers des zones d'atrophie (Bressler et al., 1990); (Klein et al., 1991).

La pathogénèse de la MLA se caractérise par une altération de la MB et une accumulation de drusen qui sont des dépôts de débris lipidiques (Soubiane, 2007) et de protéines, d'origine intraoculaire ou extraoculaire et qui forment des amas entre l'EPR et la MB (Buschini et al., 2011). Ils apparaissent comme des tâches jaunâtres de forme plus ou moins sphériques observables en fond d'œil (Buschini et al., 2011). La mise en place de ces drusen interfère avec les échanges au travers de l'EPR et la MB, induisant un stress de l'EPR (Miller, 2013).

Classiquement, les drusen peuvent être classés en 2 types de catégories: les drusen « hard » ou miliaires (Figure. 14A et C) qui sont des dépôts de petite taille (inférieur à 63 µm) qui sont de forme bien ronde, aux bords bien délimités et de couleur blanc jaunâtre. Ces

drusen sont les plus courants, qui ne sont pas associés à la DMLA, correspondent plutôt au vieillissement physiologique de l'œil.

Les drusen « softs » ou séreux sont des dépôts plus larges (supérieur à 125 µm) de forme irrégulière et aux contours diffus (Figure. 14B et D). Contrairement aux drusen hard, les drusen softs sont caractéristiques de la DMLA et se retrouvent spécifiquement au niveau de la macula.

Les analyses protéiques des soft drusen ont montré la présence des immunoglobulines (IgG) (Johnson et al., 2000), des protéines du complément (CFH, C3, C5-b9) (Johnson et al., 2000) de l'amyloïde beta et les apolipoprotéines (Apo) B et E (Anderson et al., 2001) suggérant une association entre l'inflammation et la pathologie de la DMLA.

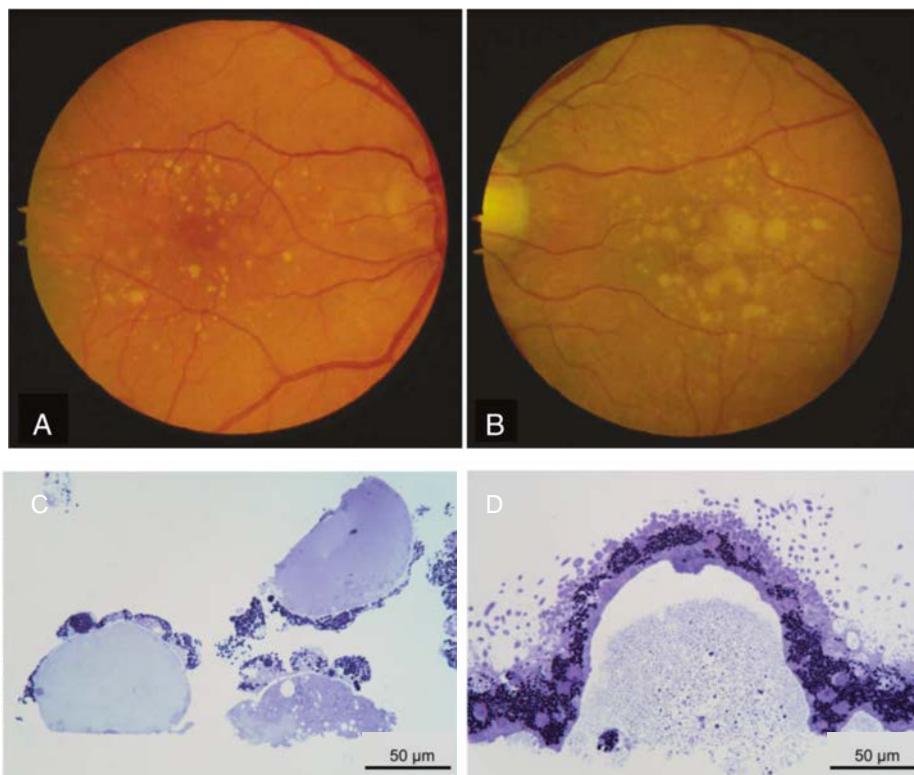


Figure 14: Les deux types de Drusen.

**A) et B) Fond d'œil avec la présence de drusen hard A) et drusen soft B).**

**C) et D) Coupe histologique de drusen hard C) et drusen soft D).**

(Hageman, Eye Res, 2001; Rudolf invest ophthalmol vis , 2008)

La lipofusine est un ensemble de composés hétérogènes issu de la dégradation incomplète des débris de SE par l'EPR (Sparrow and Boulton, 2005). Ces granules sont des dérivés de lysosomes qui ont perdu leur capacité de dégradation (Figure. 15). L'analyse des lipofuscines montre des complexes lipido-protéiques non dégradables (Murdaugh et al., 2011) comme le pyridinium bis-rétinoïde (A2E) un dérivé de la vitamine A, contenue en

abondance dans les SE des PR. Cette dernière absorbe la lumière bleue et génère des photoproducts toxiques notamment des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Wielgus et al., 2010). Si la corrélation entre la lipofusine et la DMLA n'est pas clairement démontrée, il est admis que son accumulation dans les cellules de l'EPR précède généralement l'apparition des premiers symptômes (Holz et al., 2007).

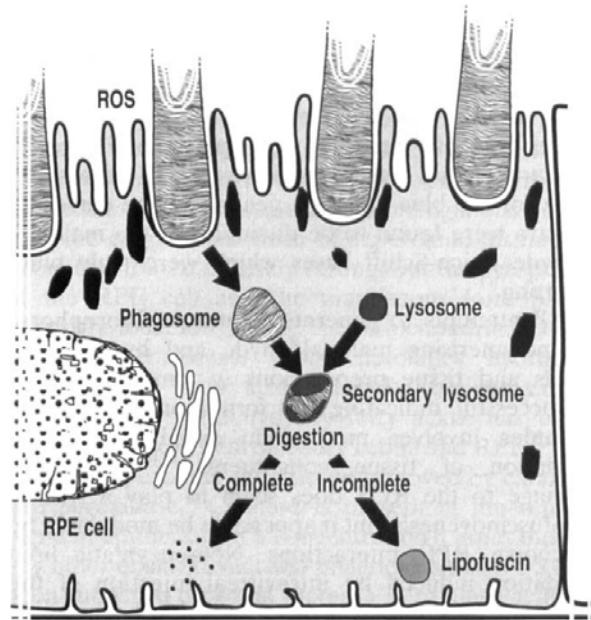


Figure 15: Formation des granules de lipofuscine.  
(Kennedy, 1995)

## 2-4 DMLA

### 2-4-1 La forme exsudative

La forme néovasculaire de la DMLA est celle qui a suscité le plus d'intérêt sur le plan thérapeutique puisque l'apparition de ces néovaisseaux conduit rapidement à une perte de la vision centrale (Figure. 16A) (Parier and Soubrane, 2008). Elle est généralement diagnostiquée par la présence au niveau de la macula d'un œdème, la présence d'excédats et de vaisseaux sanguins provenant de la choroïde (Figure. 16B) (Coleman et al., 2008). Il existe 2 types de néovaisseaux dans la pathologie de la DMLA exsudative. Les vaisseaux sous-épithéliaux (appelés aussi occultes), les plus nombreux, traversent la MB et se retrouvent sous l'EPR sans le traverser (Figure. 16C), et les vaisseaux pré-épithéliaux (ou classiques) qui sont visibles en fond d'œil, traversent l'EPR pour proliférer au niveau de la

CNE (Figure. 16D) (Soubrane, 2007). Ces 2 types de vaisseaux peuvent être « dormants » ou peu évolutifs. Ces vaisseaux sont des capillaires immatures qui laissent diffuser les fluides ce qui peut causer des exsudats et un décollement de la rétine et/ou de l'EPR (Ambati et al., 2003a).

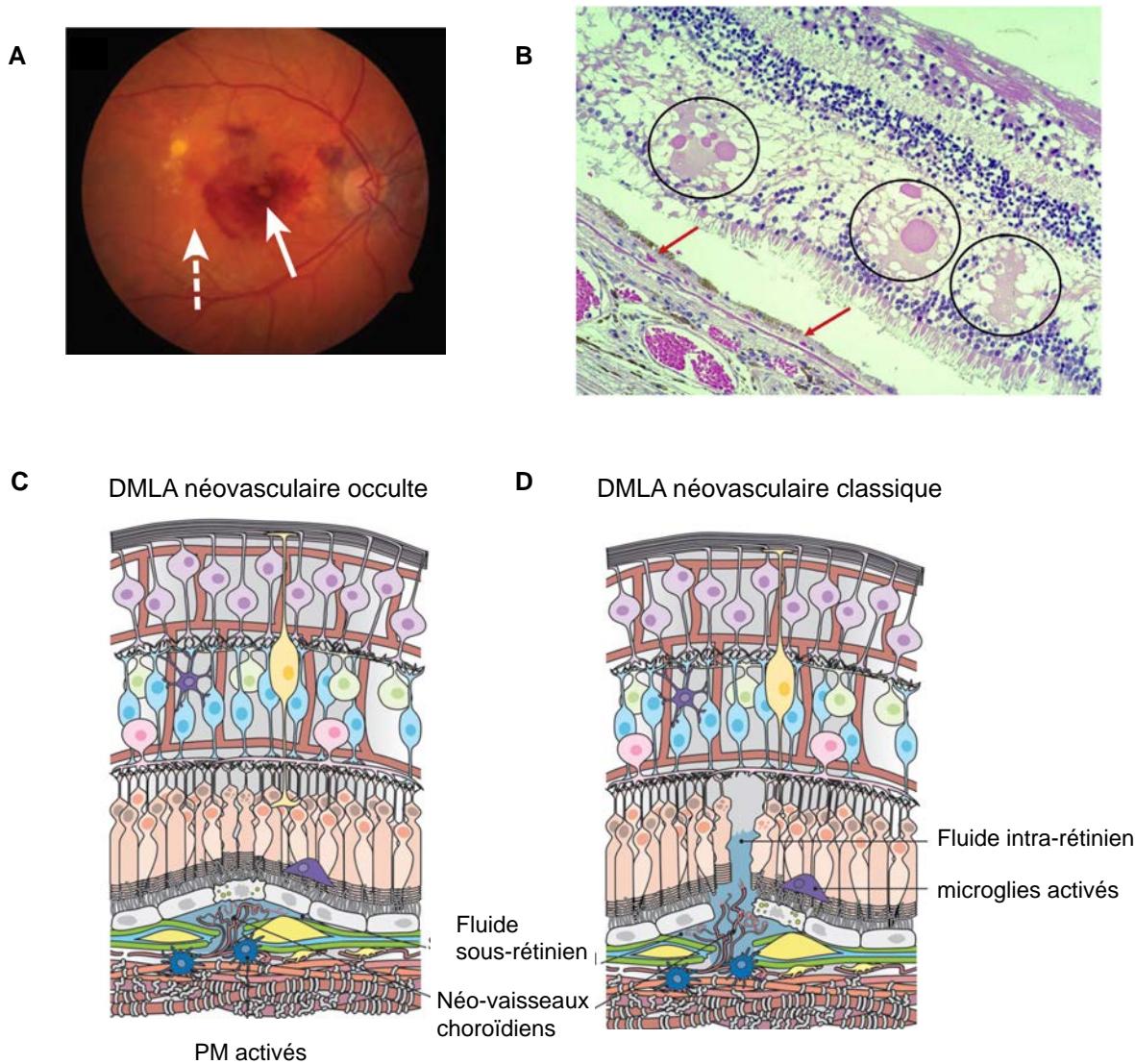


Figure 16: DMLA, la forme néovasculaire.

- A) Fond d'œil d'un patient atteint de la forme néovasculaire qui présente un exsudat sous-rétinien (flèche discontinue) et une hémorragie sous-rétinienne.
  - B) Coupe histologique d'un patient atteint d'une DMLA humide avec la présence de néovaisseaux choroïdiens entre l'EPR et la MB (flèches rouges) et des exsudats au niveau de la couche plexiforme externe (cercles).
  - C) et D) Schémas représentants les deux formes de néovaisseaux.
- (d'après Swaroop, 2009; Ding eye research, 2009 et Van Lookeren Campagne, 2014)

Même s'il n'existe pas de traitement curatif aujourd'hui, il existe des traitements pour limiter la perte visuelle. Les anti-angiogéniques sont des traitements ciblant le Vascular Endothelium Growth Factor (VEGF) (Ferrara, 2004) qui joue un rôle important dans le développement des néovascularisations choroïdiennes et la formation d'œdème. Ces anti-angiogéniques représentent actuellement le moyen thérapeutique le plus efficace pour inhiber les néovascularisations. Le Ranibizumab (Lucentis) est un anticorps anti-VEGF, qui est constitué d'un fragment d'anticorps neutralisant et se fixe sur toutes les isoformes du VEGF-A. Des études ont observé que les patients traités avec une injection intravitréenne mensuelle montrent une amélioration rapide de l'acuité visuelle par rapport aux patients traités avec le placebo (Rosenfeld et al., 2006); (Brown et al., 2006). L'étude a été menée sur deux ans.

Il existe un autre anticorps spécifique de toutes les isoformes du VEGF-A, le bevacizumab (Avastin). Contrairement à Lucentis, Avastin est un anticorps complet qui possède la même efficacité thérapeutique pour traiter la DMLA humide (Chakravarthy et al., 2013). L'avantage de l'Avastin est qu'il est beaucoup moins cher mais cet anticorps n'a pas encore reçu l'autorisation de mise sur le marché pour traiter la DMLA.

Un autre moyen thérapeutique a été mis au point pour les patients qui deviendraient résistants aux anticorps évoqués ci-dessus. Il s'agit de l'afibbercept (Eylea), une protéine de fusion constituée de la fraction constante d'une immunoglobuline fusionnée à deux fragments de VEGF-R1 et VEGF-R2 (les récepteurs du VEGF). L'injection intravitréenne tous les mois d'Eylea semble présenter la efficacité que le ranibizumab et permet de diminuer significativement les symptômes de la DMLA humide (Heier et al., 2012).

## 2-4-2 La forme atrophique

L'atrophie géographique (GA) est caractérisée par une dégénérescence progressive par apoptose des cellules de l'épithélium pigmentaire, des photorécepteurs et une altération au niveau de la MB et de la choriocapillaire (Soubrane, 2007). Les symptômes peuvent être une diminution de la sensibilité aux contrastes, une baisse des capacités visuelles en faible luminosité puis un scotome central (Soubrane, 2007).

Il a souvent été observé que le point de départ de l'atrophie se situe à l'extérieur de la fovéa (Sarks et al., 1988). La baisse visuelle n'est que modérée pendant longtemps malgré la perte des PR. Bien que la GA ait longtemps été associée à une dégénérescence primaire des cônes, les cônes sont en réalité plus robustes que les bâtonnets et la dégénérescence touche en premier les bâtonnets de la région péri-foviale avec une épargne centrale des cônes longtemps respectée (Curcio et al., 1996).

La perte tardive des cônes pourrait être ainsi une conséquence directe de la dégénérescence primaire des bâtonnets. En effet, Leveillard et al ont montré dans la rétinite pigmentaire que les bâtonnets sécrétaient un facteur trophique appelé rod-derived cone viability factor (RdCVF) qui permettrait de maintenir la fonction et la viabilité des cônes et l'absence de ce dernier pourrait être à l'origine de la mort des cônes (Leveillard et al., 2004). Pour les stades avancés de l'atrophie, on peut observer chez les patients des plages de dégénérescence de couleur plus claire que le reste de la rétine intacte (Coleman et al., 2008). Dans cette zone atrophique, les PR, l'EPR et la choriocapillaire sont absents. Il n'existe plus de CNE, ce qui entraîne un contact direct entre le CPE et le dépôt laminaire basal (Figure. 17A, B et C). Au niveau de la macula, plus de 80 % de PR sont dégénérés. Les PR restants dans les zones atrophiques présentent une morphologie complètement anormale avec un SI élargi et dépourvu de SE (Figure. 17D) (Soubrane, 2007); (Young, 1987).

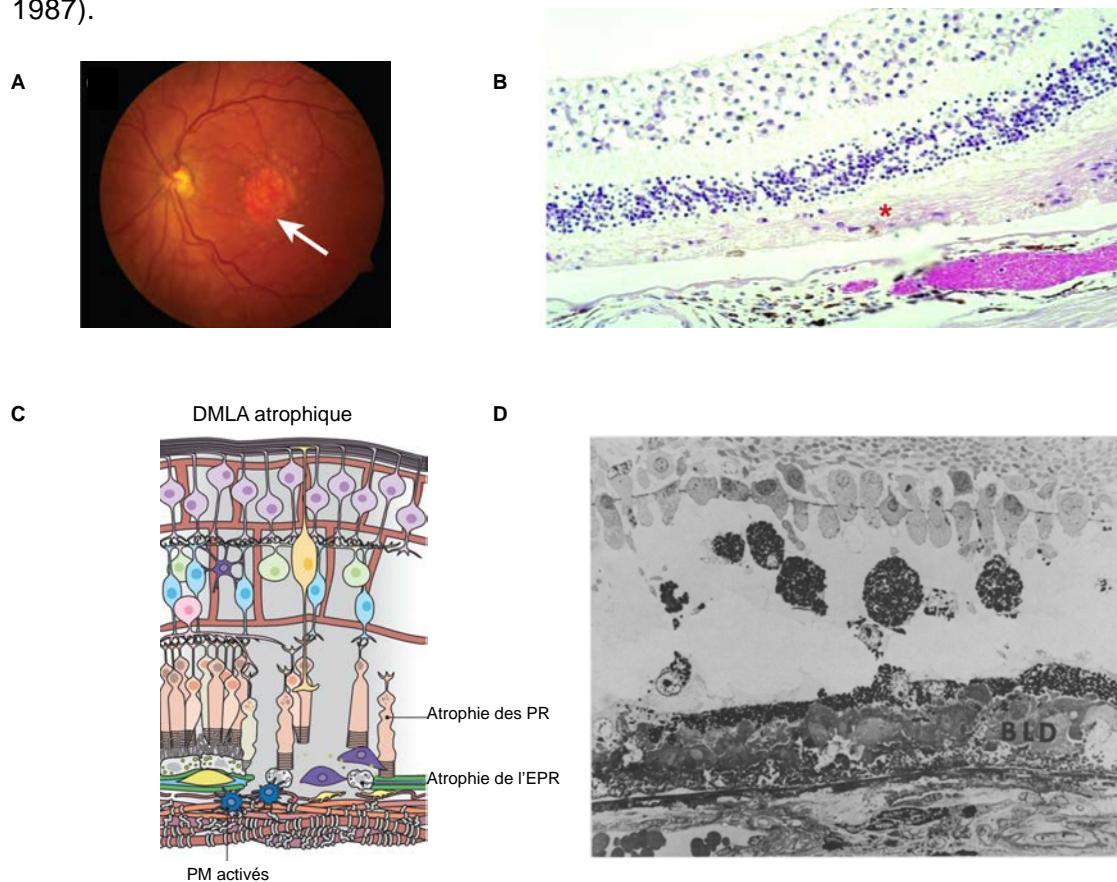


Figure 17: DMLA, la forme atrophique.

A) Fond d'œil d'un patient atteint de la forme atrophique qui présente une plaque d'atrophie.

B) Coupe histologique d'un patient atteint d'une DMLA sèche avec une dégénérescence de l'EPR et une absence totale de la CNE.

C) Schéma représentant la forme atrophique.

D) Photographie d'une zone atrophique: les quelques PR restant ont un SI élargi et dépourvu de SE.

(d'après Swaroop, 2009; Ding eye research, 2009; Van Lookeren Campagne, 2014; Young,

Les mécanismes et la chronologie des évènements qui conduisent à la GA restent encore peu clairs mais plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'apparition de cette atrophie.

-Un dysfonctionnement du métabolisme des cellules de l'EPR pourrait être à l'origine de la pathologie. En plus d'être soumis à l'accumulation de déchets cellulaires provenant des PR (lipofuscines, débris issus de la phagocytose incomplète des SE) l'EPR est continuellement exposé aux lésions induites par les photons de la lumière qui ne sont pas neutralisés malgré la présence de mélanine.

La diminution du taux de phagocytose des SE des PR par l'EPR entraîne une accumulation de disques non recyclés, ce qui est très délétère pour les PR également (Kevany and Palczewski, 2010). De plus, l'augmentation de la lipofuscine, induit une augmentation de la taille des cellules de l'EPR, une perte de leur forme cubique et une réduction importante des surfaces d'échange (Sarks et al., 1988). Les cellules qui perdent leur pigment sont phagocytées par les cellules voisines ou par les phagocytes mononucléés (PM) circulants. Les cellules restantes migrent et tentent de recouvrir la surface afin de garder l'étanchéité et de maintenir sa fonction de barrière. Lorsque la perte cellulaire devient trop importante, une atrophie en résulte. Ainsi, l'apoptose des cellules de l'EPR s'accompagne d'une dégénérescence massive des PR (Soubrane, 2007).

-La MB semble contribuer également à l'étiologie de la GA. Au cours du vieillissement, la MB subit de nombreuses modifications fonctionnelles et structurales. Des études ont montré un lien direct entre le vieillissement et un épaississement (Okubo et al., 1999) et une diminution de la perméabilité de la MB. L'apparition de débris dans la MB se fait en même temps que l'augmentation de la lipofuscine dans les cellules de l'EPR. Ces dépôts comportent du collagène, des corps résiduels et d'acides gras (Sarks et al., 1999). Avec l'âge, l'épaisseur de la MB peut augmenter de 135 % passant de 2 µm de la naissance à 4.7 µm à l'âge de 90 ans (Ramrattan et al., 1994).

L'épaississement et les modifications biochimiques de la MB réduisent le passage des métabolites nécessaires à la survie de l'EPR et des PR et inversement l'élimination des déchets métaboliques de la rétine et de l'EPR vers la choroïde (Cankova et al., 2011). Cela pourrait être à l'origine de la dégénérescence progressive des PR et de l'EPR.

-Les patients atteints d'atrophie géographique présentent également une involution du réseau choriocapillaire circulant entre la MB et les vaisseaux choroïdiens (Coleman et al., 2008).

Au cours de la DMLA atrophique, la choriocapillaire finit par se scléroser et s'atrophier suggérant une baisse des échanges (McLeod et al., 2002). Avec l'âge, l'épaisseur de la

choriocapillaire peut diminuer de 200 µm à la naissance à 80 µm à l'âge de 80 ans (Ramrattan et al., 1994). Ceci a pour la conséquence directe une baisse relative de l'apport d'oxygène et de nutriments. Ceci peut être expliqué par le fait que l'accumulation des débris au niveau de la MB pourraient gêner la diffusion de facteurs trophiques comme la sécrétion de VEGF par l'EPR vers les choriocapillaires ce qui induiraient une involution des choriocapillaires (Saint-Geniez et al., 2009).

### 2-4-3 Facteurs de risques

La DMLA est une pathologie multifactorielle évoluant sur une base génétique déterminée et soumise à l'influence de facteurs environnementaux.

#### 2-4-3-1 Facteurs environnementaux

L'âge est évidemment le premier facteur de risque pour la DMLA. Toutes les études basées sur un grand nombre de patients montrent que la prévalence augmente fortement avec l'âge (Klein et al., 1997); (VanNewkirk et al., 2000); (Friedman et al., 2004). La population atteinte de DMLA est de 2 % pour les moins de 60 ans et passe de 30 % pour les personnes de 75 ans (Bernstein, 2009).

Le tabac est le deuxième facteur environnemental le plus fortement associé à la DMLA (Delcourt et al., 1998); (Vingerling et al., 1996); (Klein et al., 1993).

Il existe une association directe entre le risque de développer une DMLA tardive et le nombre de cigarettes consommé (Delcourt et al., 1998); (Khan et al., 2006b). Cependant les mécanismes par lesquels la cigarette pourrait agir au niveau de la rétine restent inconnus. Des auteurs ont suggéré que la fumée pourrait altérer la production d'antioxydants (vitamine C, caroténoïde), favoriser la production de ROS et affecter le système cardiovasculaire (Tsoumakidou et al., 2008).

La DMLA est plus fréquente dans la population caucasienne que chez les autres ethnies (Klein et al., 1999); (Schachat et al., 1995). Néanmoins, l'AREDS a montré que la fréquence d'observer des drusen est identique entre les groupes ethniques. Ceci peut être expliqué par les propriétés anti-oxydantes de la mélanine qui protège contre les ROS produits par les photons et la phagocytose des différents débris par l'EPR.

Des chercheurs se sont intéressés à l'association entre les pathologies cardiovasculaires et la DMLA, étant donné qu'elle est associée à une accumulation de dépôts lipidiques entre l'EPR et la MB. Ainsi, la consommation de graisses saturées et de cholestérol augmente la

survenue d'une DMLA, tout en favorisant sa progression (Chiu et al., 2007). Au contraire, la consommation d'oméga-3 (acides gras polyinsaturés) semblerait exercer une action préventive vis-à-vis de la DMLA et freinerait même sa progression chez les personnes déjà atteintes mais les études ne sont pas toujours consistantes (Hodge et al., 2006).

L'obésité et plus particulièrement l'indice de masse corporelle est également liée à un risque plus importante de développer une DMLA (Schaumberg et al., 2001); (Ersoy et al., 2014).

De même que l'athérosclérose (Klein et al., 2006). Dans une étude de Rotterdam, la présence de plaques d'athéromes dans l'artère carotidienne augmenterait significativement le risque de développer une DMLA (Vingerling et al., 1995).

Et enfin la lumière pourrait également être un facteur de risque de la DMLA (Taylor et al., 1992); (Cruickshanks et al., 2001). Cependant d'autres études n'ont pas retrouvé cette association (Khan et al., 2006a).

#### 2-4-3-2 Facteurs génétiques

De nombreux gènes sont associés à la pathologie de la DMLA (Figure. 18). Dans cette partie, seuls les principaux facteurs génétiques impliqués dans la DMLA seront détaillés.

Il a été montré que l'histoire familiale est un des facteurs génétiques le plus important. En effet, Klaver et ses collègues ont estimé que les frères et sœurs d'un patient atteint de DMLA tardive avaient 20 fois plus de risque d'être également atteint de la même pathologie. Ils suggèrent que 23 % des DMLA avancées pourraient être expliquées par la part génétique (Klaver et al., 1998). Depuis le séquençage du génome humain, de nombreux facteurs génétiques ont pu être identifiés comme étant impliqués dans la DMLA (Haddad et al., 2006); (Scholl et al., 2007).

En 2005, plusieurs études ont montré que le principal facteur génétique associée à la DMLA était des polymorphismes dans le gène du complément facteur H (CFH) qui est impliqué dans la voie alterne du système du complément (Edwards et al., 2005); (Klein et al., 2005); (Haines et al., 2005); (Hageman et al., 2005). Le gène est localisé sur le chromosome 1q32 et possède de nombreux polymorphismes dont Y402H (la tyrosine en position 402 est remplacée par une histidine) (Souied et al., 2005); (Sepp et al., 2006); (Magnusson et al., 2006). Une étude a montré un risque 7,4 fois supérieur de développer une forme avancée de la DMLA pour les porteurs homozygotes (Klein et al., 2005). D'autres auteurs ont confirmé

que le polymorphisme Y402H est associé avec les formes tardives de la DMLA atrophique et néovasculaire (Magnusson et al., 2006).

SNP/Risk Allele	Chromosome, Position	Nearby Genes	EAF	Discovery	
				P	OR
<i>Loci Previously Reported With P &lt; 5×10<sup>-8</sup></i>					
rs10490924/T	10      124.2 Mb	<i>ARMS2/HTRA1</i>	0.30	4×10 <sup>-353</sup>	2.71
rs10737680/A	1      196.7 Mb	<i>CFH</i>	0.64	1×10 <sup>-283</sup>	2.40
rs429608/G	6      31.9 Mb	<i>C2/CFB</i>	0.86	2×10 <sup>-54</sup>	1.67
rs2230199/C	19      6.7 Mb	<i>C3</i>	0.20	2×10 <sup>-26</sup>	1.46
rs5749482/G	22      33.1 Mb	<i>TIMP3</i>	0.74	6×10 <sup>-13</sup>	1.25
rs4420638/A	19      45.4 Mb	<i>APOE</i>	0.83	3×10 <sup>-15</sup>	1.34
rs1864163/G	16      57 Mb	<i>CETP</i>	0.76	8×10 <sup>-13</sup>	1.25
rs943080/T	6      43.8 Mb	<i>VEGFA</i>	0.51	4×10 <sup>-12</sup>	1.18
rs13278062/T	8      23.1 Mb	<i>TNFRSF10A</i>	0.48	7×10 <sup>-10</sup>	1.17
rs920915/C	15      58.7 Mb	<i>LIPC</i>	0.48	2×10 <sup>-9</sup>	1.14
rs4698775/G	4      110.6 Mb	<i>CFI</i>	0.31	2×10 <sup>-10</sup>	1.16
rs3812111/T	6      116.4 Mb	<i>COL10A1</i>	0.64	7×10 <sup>-8</sup>	1.13
<i>Loci Reaching P &lt; 5×10<sup>-8</sup> for the First Time</i>					
rs13081855/T	3      99.5 Mb	<i>COL8A1/FILIPIL</i>	0.10	4×10 <sup>-11</sup>	1.28
rs3130783/A	6      30.8 Mb	<i>IER3/DDRI</i>	0.79	1×10 <sup>-6</sup>	1.15
rs8135665/T	22      38.5 Mb	<i>SLC16A8</i>	0.21	8×10 <sup>-8</sup>	1.16
rs334353/T	9      101.9 Mb	<i>TGFBR1</i>	0.73	9×10 <sup>-7</sup>	1.13
rs8017304/A	14      68.8 Mb	<i>RAD51B</i>	0.61	9×10 <sup>-7</sup>	1.11
rs6795735/T	3      64.7 Mb	<i>ADAMTS9/MIR548A2</i>	0.46	9×10 <sup>-8</sup>	1.13
rs9542236/C	13      31.8 Mb	<i>B3GALT1</i>	0.44	2×10 <sup>-6</sup>	1.12

Figure 18: Les différents gènes associés à la pathologie de la DMLA.  
(d'après The AMD gene consortium, Nat genet, 2013)

Un second locus important (AMRS2 et HTRA1), sur le chromosome 10q26 est également impliqué dans les deux formes de la DMLA (Rivera et al., 2005); (Jakobsdottir et al., 2005); (Dewan et al., 2006).

Ce loci contient 1 gène nommé ARMS2 (age related macular susceptibility 2) dont le polymorphisme induit une instabilité de l'ARNm qui perturberait le bon fonctionnement de la mitochondrie (Fritsche et al., 2008). Cependant, sa localisation et ses fonctions ne sont pas encore identifiées.

L'autre gène est HTRA1 (High temperature requierement factor 1) qui code pour une sérine protéase. Dans l'œil, HTRA1 est principalement exprimé par les cellules de l'EPR (Yang et al., 2006). Le polymorphisme RS10490924 est fortement associé aux patients atteints de la DMLA (Yang et al., 2006); (Rivera et al., 2005).

L'apo E qui est impliquée dans le métabolisme des lipides est également un facteur de risque génétique (Zareparsi et al., 2004). Dans l'œil, elle est exprimée dans les SE des PR, dans la CCG, dans l'EPR et par les CM (Anderson et al., 2001); (Nakai et al., 1996). Il existe trois isoformes dont Apo E2, E3, et E4. La forme E4 est protectrice vis à vis de la DMLA et aggravant vis à vis de la maladie d'Alzheimer (Mahley and Rall, 2000); (Souied et al., 1998) et inversement pour la forme E2 (McKay et al., 2011).

Améliorer la connaissance des différents facteurs génétiques et environnementaux impliqués dans la physiopathologie de la DMLA permettrait de mieux cibler les différents acteurs et de trouver des traitements thérapeutiques spécifiques.

# III- Le système des phagocytes mononucléés

## 3-1 La famille des chimiokines

Les mécanismes qui contrôlent le trafic des leucocytes en conditions physiologiques et pathologiques ont été largement mieux compris ces dix dernières années. Une migration et un recrutement appropriés des cellules de l'immunité dans le tissu affecté sont essentiels pour avoir une réponse immunitaire adaptée. Cette migration est un processus étroitement régulé mettant en jeu des interactions récepteurs-ligands (Springer, 1995). Au cours d'une inflammation, les chimiokines (Ck) permettent aux monocytes (Mo) de sortir de la moelle osseuse ou de la rate (dans certaines conditions) et de se diriger vers le tissu lésé *via* les Ck sécrétées. Elles contribuent également à les immobiliser au niveau de l'endothélium situé à proximité de la lésion (Charo and Ransohoff, 2006); (Middleton et al., 2002) et guident leur migration finale au sein du tissu.

Ce sont des protéines de petite taille spécialisées dans la communication cellulaire, qui sont efficaces à de concentrations de l'ordre du nanomolaire. Cependant, leur implication dans le système immunitaire ne se limite pas qu'à la migration cellulaire en conditions pathologiques inflammatoires. Elles interviennent également dans des phénomènes physiologiques tels que dans la neuromodulation au sein du SNC (Rostene et al., 2011), dans l'angiogenèse (Heidemann et al., 2003), dans l'apoptose ou la survie des cellules immunitaires (Landsman et al., 2009); (Levy et al., 2015). Elles sont majoritairement exprimées par les PM (Mantovani et al., 2004); (Charo and Ransohoff, 2006) mais également par d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales (Thelen, 2001); (Loetscher et al., 2000), les neurones (de Haas et al., 2007) et les cellules épithéliales (Gopal et al., 2011).

### 3-1-1 Classification

Les Ck sont généralement constituées de 60 à 80 acides aminés, de 8 à 12 kDa. Elles se fixent sur des récepteurs membranaires qui font partie de la famille des récepteurs Ck.

La classification des Ck repose sur la position relative des deux premiers résidus cystéines en position N-terminale (Bachelerie et al., 2014); (Zlotnik and Yoshie, 2000); (Bacon et al., 2002). Ces cystéines peuvent être adjacentes (sous-famille de CC, composée de 28 membres), séparées par un acide aminé (sous-famille de CXC, composée de 17 membres), séparée par 3 acides aminés (sous-famille de CX3C, composé d'un membre CX3CL1) ou ne

présentant qu'une seule cystéine en N-terminale (sous-famille de C, composée de 2 membres) (Figure. 19).

Chemokine	Other names	Receptor	Receptor	Immune cell expression
<b>G protein-coupled receptors</b>				
CXCL1	GRO $\alpha$ , MGSA, mouse KC	CXCR2	CXCR1	Neutrophil > monocyte, NK, mast cell, basophil, CD8 $+$ T <sub>EFF</sub>
CXCL2	GRO $\beta$ , MIP-2 $\alpha$ , mouse MIP2	CXCR2	CXCR2	Neutrophil > monocyte, NK, mast cell, basophil, CD8 $+$ T
CXCL3	GRO $\gamma$ , MIP-2 $\beta$	CXCR2	CXCR3	Th1, CD8 $+$ T <sub>CM</sub> and T <sub>EM</sub> , NK, NKT, pDC, B cell, Treg, Tfh
CXCL4	PF4	?	CXCR4	Most (if not all) leukocytes
CXCL5	ENA-78, mouse LIX	CXCR2	CXCR5	B cell, Tfh, Tfr, CD8 $+$ T <sub>EM</sub>
CXCL6	GCP-2 (no mouse)	CXCR1, CXCR2	CXCR6	Th1, Th17, $\gamma\delta$ T, ILC, NKT, NK, plasma cell
CXCL7	NAP-2	CXCR2	CCR1	Monocyte, macrophage, neutrophil, Th1, basophil, DC
CXCL8	IL-8 (no mouse)	CXCR1, CXCR2	CCR2	Monocyte, macrophage, Th1, iDC, basophil, NK
CXCL9	Mig	CXCR3	CCR3	Eosinophil > basophil, mast cell
CXCL10	IP-10	CXCR3	CCR4	Th2, skin- and lung-homing T, Treg > Th17, CD8 $+$ T, monocyte, B cell, iDC
CXCL11	I-TAC	CXCR3	CCR5	Monocyte, macrophage, Th1, NK, Treg, CD8 $+$ T, DC, neutrophil
CXCL12	SDF-1	CXCR4	CCR6	Th17 > iDC, $\gamma\delta$ T, NKT, NK, Treg, Tfh
CXCL13	BLC, BCA-1	CXCR5	CCR7	naive T, T <sub>CM</sub> , T <sub>RM</sub> , mDC, B cell
CXCL14	BRAK	?	CCR8	Th2, Treg, skin T <sub>RM</sub> , $\gamma\delta$ T, monocyte, macrophage
Cxcl15	Lungkine (mouse only)	?	CCR9	Gut-homing T, thymocytes, B, DC, pDC
CXCL16		CXCR6	CCR10	Skin-homing T cell, IgA-plasmablasts
CCL1	I-309, mouse TCA3	CCR8	XCR1	Cross-presenting CD8 $+$ DC, thymic DC
CCL2	MCP-1, mouse JE	CCR2	CX3CR1	Resident monocyte, macrophage, microglia, Th1, CD8 $+$ T <sub>EM</sub> , NK, $\gamma\delta$ T cell, DC
CCL3	MIP-1 $\alpha$	CCR1, CCR5	<b>Atypical (nonsignaling) receptors</b>	
CCL4	MIP-1 $\beta$	CCR5	ACKR1 (DARC; Duffy)	RBC, LEC
CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5	ACKR2 (D6)	LEC, DC, B cell
Ccl6	C-10, MRP-1 (mouse only)	Unknown	ACKR3 (CXCR7)	Stromal cells, B cell
CCL7	MCP-3, mouse Fic or MARC	CCR2, CCR3	ACKR4 (CCRL1; CCX-CKR)	Thymic epithelium
CCL8	MCP-2	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 (human); CCR8 (mouse)		
Ccl9/10	MIP-1 $\gamma$ , MRP-2 (mouse only)	Unknown		
CCL11	Eotaxin-1	CCR3		
Ccl12	MCP-5 (mouse only)	CCR2		
CCL13	MCP-4 (no mouse)	CCR2, CCR3, CCR5		
CCL14	HCC-1 (no mouse)	CCR1		
CCL15	Leukotactin-1, HCC-2, MIP-5 (no mouse)	CCR1, CCR3		
CCL16	HCC-4, NCC-4, LEC (no mouse)	CCR1, CCR2, CCR5		
CCL17	TARC	CCR4		
CCL18	PARC, DC-CK1 (no mouse)	CCR8		
CCL19	ELC, MIP-3 $\beta$	CCR7		
CCL20	MIP-3 $\alpha$ , LARC	CCR6		
CCL21	SLC, 6CKine	CCR6, CCR7		
CCL22	MDC	CCR4		
CCL23	MPIF-1, MIP-3 (no mouse)	Unknown		
CCL24	Eotaxin-2, MPIF-2	CCR3		
CCL25	TECK	CCR9		
CCL26	Eotaxin-3	CCR3, CX3CR1		
CCL27	CTAK	CCR10		
CCL28	MEC	CCR3, CCR10		
XCL1	Lymphotactin $\alpha$ , SCM-1 $\alpha$	XCR1		
XCL2	Lymphotactin $\beta$ , SCM-1 $\beta$ (no mouse)	XCR1		
CX3CL1	Fractalkine	CX3CR1		

Figure 19: Classification des différentes chimiokines et récepteurs chimiokines exprimés par les leucocytes.

**Les Ck sont divisées en sous familles sur la base du nombre et de l'emplacement de cystéines situées en N-terminal.**

(Griffith, Annu Rev Immunol, 2014)

### 3-1-2 Les récepteurs chimiokines

Les récepteurs Ck sont exprimés par un grand nombre de cellules, en particulier par les cellules hématopoïétiques telles que les Mo, les CM, les macrophages (Mp) et les cellules dendritiques (Mantovani et al., 2004); (Charo and Ransohoff, 2006). Ces récepteurs appartiennent à la grande famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à la protéine G, les GPCR.

Ces récepteurs aux Ck sont répartis selon la même nomenclature que les quatre sous-familles de CK: les CCR- (composé de 10 membres), les CXCR- (composé de 7 membres), XCR- (1 membre) et CX3CR- (1 membre) (Figure. 19). A part quelques exceptions, un récepteur CK ne peut interagir qu'avec des Ck appartenant à la même famille.

### 3-1-3 Interactions Chimiokine-Récepteur

La diversité des Ck et des récepteurs Ck forme un réseau complexe qui permet de moduler finement les interactions entre les cellules. Une Ck peut se lier à différents récepteurs et inversement, un récepteur à plusieurs Ck (Figure. 19). Cette redondance importante permet d'établir un système de compensation. Elle entretient la robustesse et l'adaptabilité de la réponse inflammatoire qui est contrôlée par un réseau protéiques et non par une seule Ck. Ces phénomènes de compensation peuvent rendre parfois difficile les interprétations de résultats. En effet, dans les modèles de délétion génétique, l'absence de l'expression d'une Ck ne va pas nécessairement se traduire par un phénotype anormal.

Il existe néanmoins des exceptions, des récepteurs qui n'ont qu'un seul ligand comme CX3CR1 ou encore CXCR6 qui sont dit « monogames ».

### 3-1-4 Implication de l'axe CCL2/CCR2 et CX3CL1/CX3CR1 dans les pathologies

Nous allons principalement nous intéresser à l'axe CCL2/CCR2 et à l'axe CX3CL1/CX3CR1 qui semblent jouer un rôle essentiel dans nos modèles de souris, pour étudier la pathologie de la DMLA.

### 3-1-4-1 L'axe CX3CL1/CX3CR1

La Ck CX3CL1 (aussi appelée fractalkine) a été identifiée chez l'homme en 1997 par Bazan (Bazan et al., 1997). La chaîne protéique de CX3CL1 est hautement conservée entre l'homme et la souris (Rossi et al., 1998). Elle est la seule Ck avec CXCL16 à exister sous la forme membranaire (Huang et al., 2009). Le domaine membranaire de CX3CL1 peut être clivé sous l'action d'enzyme protéolytique comme la TNF $\alpha$  converting enzyme (ADAM 7 en conditions inflammatoires) et ADAM 10 en conditions normales (Figure. 20) (Tsou et al., 2001); (Garton et al., 2001); (Hundhausen et al., 2003). Elle est exprimée par de nombreux types cellulaires tels que les cellules endothéliales (Imaizumi et al., 2004), épithéliales (Muehlhoefer et al., 2000), les neurones (Sheridan and Murphy, 2013) et les CM (Lindia et al., 2005).

Le récepteur CX3CR1 a été caractérisé en 1994 par Harrison (Harrison et al., 1994). Il appartient à la famille des GPCR. Les études biochimiques ont montré que les CX3CR1 se fixent avec la même affinité que ce soit avec la forme membranaire que soluble. Ce récepteur est fortement exprimé par les neutrophiles, les cellules NK, les Mo, les CM, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales (Imai et al., 1997).

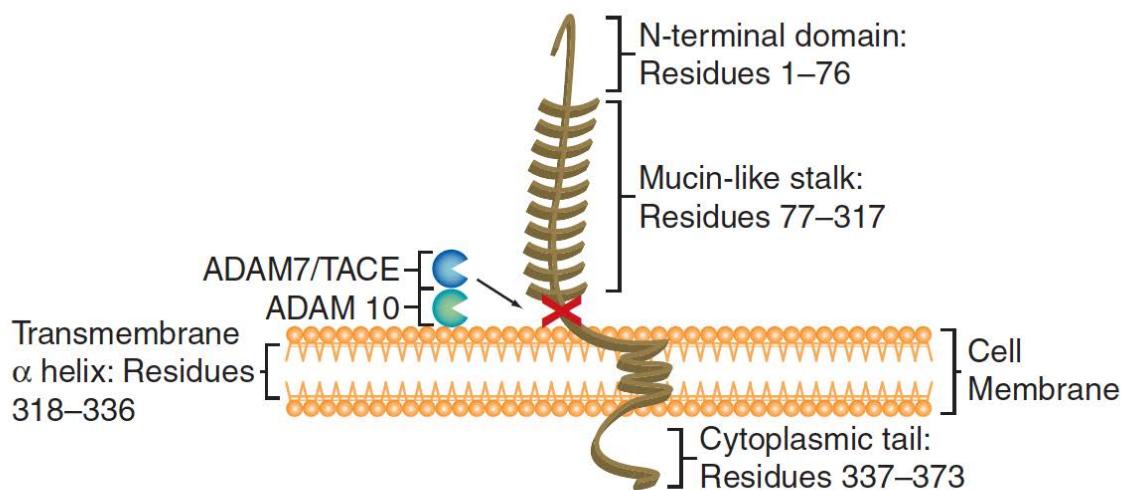


Figure 20: Structure schématique représentant la fractalkine/CX3CL1.  
(Jones, molecular interventions, 2010)

Les fonctions de l'axe CX3CL1/CX3CR1 sont très différentes que ce soit en central ou en périphérie.

En périphérie, il est clairement démontré que CX3CL1/CX3CR1 est directement impliqué dans le recrutement, la migration et l'activation de cellules inflammatoires du sang vers le tissu inflammé (Nishimura et al., 2002).

CX3CL1 est notamment impliqué dans la pathologie de l'athérosclérose. Les cellules endothéliales produisent une large quantité de CX3CL1 en conditions inflammatoires (Greaves and Gordon, 2001). La forme membranaire renforcerait l'adhésion des Mo circulants et la forme soluble permettrait de recruter les Mo patrouilleurs qui sont CX3CR1<sup>high</sup> au niveau des plaques d'athérome. Ainsi, il a été observé chez les souris déficientes en CX3CR1 une diminution importante du nombre de PM infiltrants et une diminution de la formation des plaques d'athéromes (Combadiere et al., 2003); (Lesnik et al., 2003).

Le rôle de CX3CL1/CX3CR1 est totalement différent au niveau du SNC. CX3CL1 est constitutivement exprimée par les neurones dans le SNC et joue un rôle clé dans la communication neurone-CM (Harrison et al., 1998). CX3CL1 est présent à la surface des neurones (Clark et al., 2009) et CX3CR1 est principalement exprimé par les CM (Harrison et al., 1998); (Lindia et al., 2005). La liaison entre CX3CL1 et son récepteur contribue à l'atténuation de l'activation des CM en conditions physiologiques. *In vitro*, CX3CL1 inhibe la production de cytokines comme IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  ou encore iNOS induit par le LPS dans les CM (Mizuno et al., 2003). De même *in vivo*, il a été démontré que l'inhibition de le CX3CL1 endogène induisait une augmentation de la production de TNF $\alpha$  et de ROS après injection de LPS par voie intracérébroventriculaire (Zujovic et al., 2001).

Il semblerait que dans le SNC, l'invalidation de l'axe CX3CL1/CX3CR1 soit très délétère, en induisant l'activation des CM qui seraient responsables de la mise en place de l'inflammation chronique dans de nombreuses pathologies (Sennlaub et al., 2013); (Cardona et al., 2006); (Kezic et al., 2013).

Cardona et ses collaborateurs (Cardona et al., 2006) ont montré dans un modèle de Parkinson et de sclérose latérale amyotrophique que la déficience en *Cx3cr1* induisait un défaut de migration des CM au niveau du site de lésion et une augmentation de la mort neuronale. En effet, l'absence de CX3CR1 au niveau des CM entraînerait une neurotoxicité plus importante en surexprimant IL-1 $\beta$ . Cependant, les mécanismes de cette surexpression restent à déterminer. Il a été récemment démontré que la déficience en *Cx3cr1* induisait un effet protecteur dans les stades précoce (à jour 4) après un traumatisme crânien (une survie plus importante des neurones dans le cortex et une moindre accumulation des cellules CD11b+ au niveau de la lésion). Tandis que 5 semaines après le traumatisme crânien, la déficience en *Cx3cr1* induisait une mort plus importante des neurones et une accumulation plus importante des cellules CD11b+ au niveau de la lésion (Zanier et al., 2015). Ces

résultats suggèrent que l'axe CX3CL1/CX3CR1 pourrait avoir des rôles différents en fonction du temps.

Par contre, dans la maladie d'Alzheimer, l'invalidation de l'axe CX3CL1/CX3CR1 semblerait bénéfique puisque l'absence de *Cx3cr1* induirait une diminution des dépôts  $\beta$ -amyloïde et une diminution de la perte neuronale (Lee et al., 2010); (Fuhrmann et al., 2010).

### 3-1-4-2 Axe CCL2/CCR2

Le deuxième axe de régulation des PM dans le SNC est l'axe CCL2/CCR2 (Chimiokine receptor 2) qui est impliqué dans le recrutement des Mo inflammatoires CCR2+ de la circulation sanguine originale de la moelle osseuse.

CCL2 (MCP-1) fait partie de la famille des Ck CC et joue un rôle crucial dans l'attraction et l'infiltration des PM (Huang et al., 2001). Le gène humain *Ccl2* est localisé sur le chromosome 17q11.2, la protéine humaine est composée de 76 acides aminés et fait 13 kDa (Van Coillie et al., 1999).

Elle est exprimée par de nombreux types cellulaires comme les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses (Cushing et al., 1990), les cellules épithéliales (Standiford et al., 1991), les astrocytes (Barna et al., 1994) et les CM (Hinojosa et al., 2011). Toutefois, les Mo/Mp semblent être la source majeure de CCL2 (Yoshimura et al., 1989).

Dans la pathologie de l'athérosclérose, les Mo circulants inflammatoires sont recrutés dans les lésions d'athéromes où CCL2 est fortement exprimée. L'invalidation de *Ccr2* entraîne une diminution de 50 % de la taille des plaques et de 60 % des Mo infiltrants (Ikeda et al., 2002).

Tout comme pour l'axe CX3CR1/CX3CL1, la mobilisation de PM par l'axe CCR2/CCL2 peut avoir des effets bénéfiques ou délétères:

Au niveau du SNC, il a été montré dans un modèle de détachement rétinien, que la dégénérescence des PR est associée à une expression accrue de CCL2 dans la rétine ce qui contribuerait aux recrutements des PM (Nakazawa et al., 2007).

De même chez les patients atteints de rétinopathie diabétique, il a été observé une augmentation du nombre de PM activés qui est associée à une forte expression de CCL2 (Meleth et al., 2005).

Enfin, nous avons récemment montré une augmentation significative de la concentration de CCL2 dans les humeurs aqueuses des patients atteints d'atrophie, qui est associée à la présence de cellules CCR2+ dans l'espace sous-rétinien à proximité des zones atrophiques (Sennlaub et al., 2013).

Cependant l'invalidation de *Ccr2* peut également s'avérer délétère. Effectivement, la déficience de *Ccr2* dans 2 modèles d'Alzheimer (souris Tg 2576 et APPswe/PS1) entraîne une perte de la mémoire et une formation plus importante de plaques  $\beta$ -amyloïdes (El

Khoury et al., 2007); (Naert and Rivest, 2011). En effet, la déficience de *Ccr2* dans les souris Tg 2576 induit un défaut de recrutement des PM de la circulation ce qui conduit à une accumulation des plaques  $\beta$ -amyloïdes dans les vaisseaux sanguins et une mort prématuée de ces souris (El Khoury et al., 2007).

Tout cela suggère que le rôle protecteur ou aggravant du recrutement des PM via CCL2 ou CX3CL1 dépend du type de pathologie considéré.

### 3-2 Les phagocytes mononucléés

Le système des PM est un lignage myéloïde dérivant de progéniteurs de la moelle osseuse qui comprend les Mo, Mp et les cellules dendritiques (Hume, 2006); (Ransohoff and Cardona, 2010).

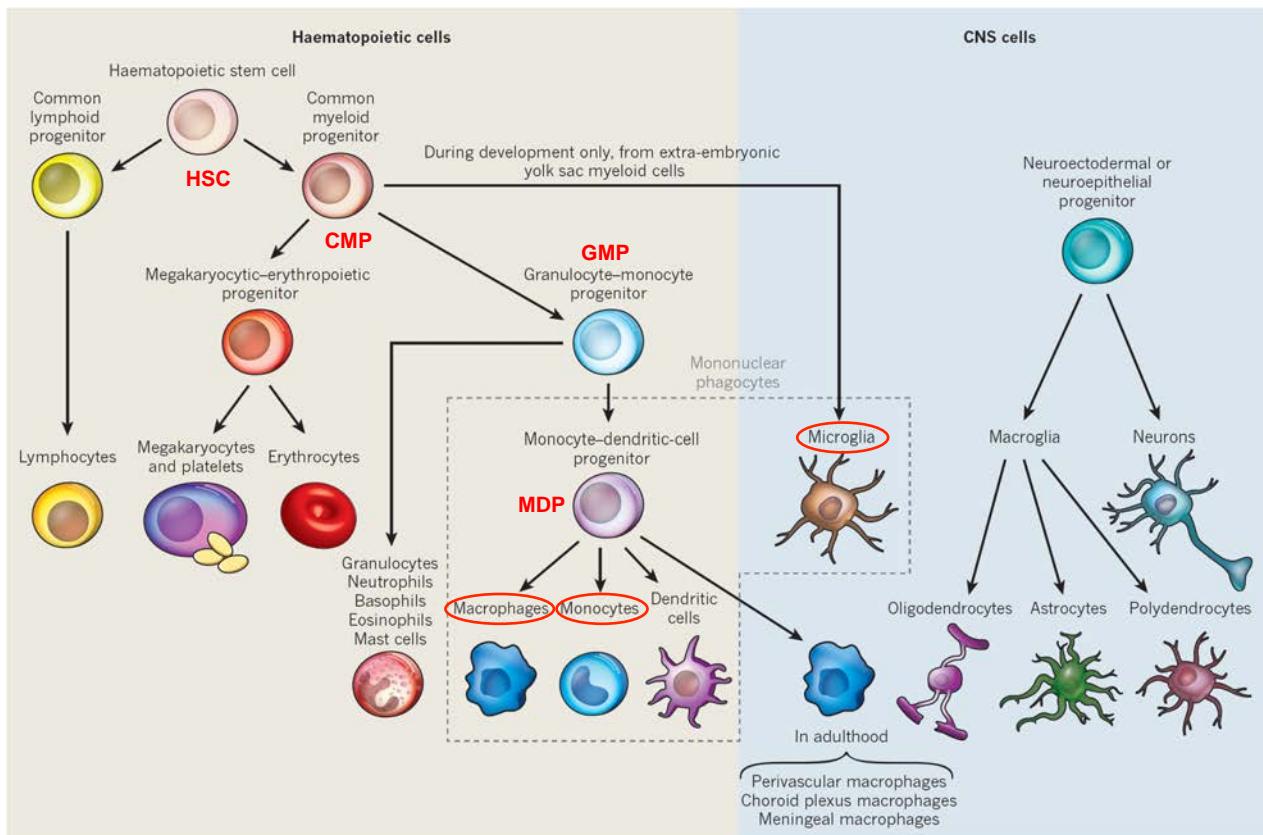


Figure 21: Origine et différenciation des monocytes.

Les Mo sont issus de la différenciation de cellules souches hématopoïétiques. HSC: Cellules souches hématopoïétiques; CMP: précurseur myéloïde commun; GMP: précurseur granulo-monocytaire; MDP: précurseurs myéloïde commun aux Mo, Mp et cellules dendritiques.

(d'après Ransohoff, nature review, 2010)

Les Mo proviennent de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (HSC) médullaires qui sont capables de reconstituer tous les types cellulaires hématopoïétiques (Osawa et al., 1996). La différenciation des HSC va engendrer un progéniteur myéloïde commun (CMP) qui se différencie à son tour en myéloblaste (GMP) capable de donner les granulocytes et les Mo. Et enfin le GMP se différencie en précurseur myéloïde (MDP) commun aux Mo, Mp et cellules dendritiques (Figure. 21) (Ransohoff and Cardona, 2010).

Dans cette partie, nous allons seulement nous intéresser aux Mo, aux Mp et aux CM.

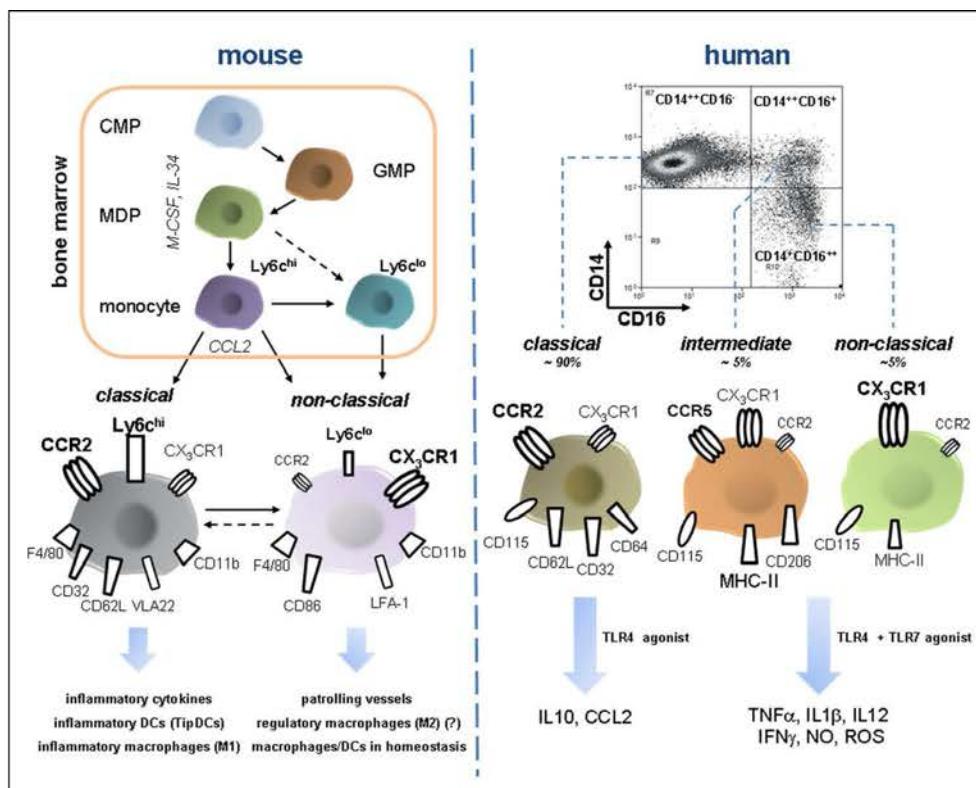


Figure 22: Comparaison entre les différentes sous-populations de monocytes humains et murins.

Les Mo murins sont classés en deux populations: les Mo classiques qui sont  $\text{Ly6c}^{\text{high}}$   $\text{CCR2}^{\text{high}}$   $\text{Cx3cr1}^{\text{low}}$  et les Mo non classiques qui sont  $\text{Ly6c}^{\text{low}}$   $\text{CCR2}^{\text{low}}$   $\text{Cx3cr1}^{\text{high}}$ .

Les trois différents sous-types de Mo humains par cytométrie en flux (en haut à droite): les Mo classique  $\text{CCR2}^{\text{high}}$   $\text{CD14}^{++}$   $\text{CD16}^{-}$ ; les Mo non classiques  $\text{Cx3cr1}^{\text{high}}$   $\text{CD14}^{+}$   $\text{CD16}^{++}$  et les Mo intermédiaires  $\text{CD14}^{++}$   $\text{CD16}^{+}$ .

(Zimmermann, frontiers, 2012)

### 3-2-1 Les Monocytes

Les Mo sont les leucocytes circulants qui représentent environ 10 % des leucocytes dans le sang humain et 3% chez la souris (en fonction des fonds génétiques) (Nichols et al., 1971). La maturation des Mo s'effectue dans la moelle osseuse, puis ils sont libérés dans le sang et colonisent les tissus où ils se différencient en macrophages ou en cellules dendritiques. Depuis quelques années, de nombreux travaux s'intéressent aux Mo non plus comme un état transitionnel vers le macrophage mais comme un type cellulaire à part entière.

#### 3-2-1-1 Les monocytes humains

Au début des années 80, des études ont montré l'existence d'une hétérogénéité morphologique et fonctionnelle des Mo humains (Passlick et al., 1989). Trois sous-populations de Mo sanguins ont été identifiées (Figure. 22) et ont été définies par l'expression du CD14 (corécepteur du lipopolysaccharide) et du CD16 (récepteur IgG).

##### 3-2-1-1-1 Les monocytes CD14++CD16-: les monocytes « classiques »

Les Mo classiques (CD14++CD16-) représentent 80 à 90% des Mo circulants (Soehnlein and Lindbom, 2010); (Strauss-Ayali et al., 2007), de grande taille et qui expriment fortement le marqueur de surface CD14 et faiblement CD16. Ils sont également CCR2<sup>high</sup> et sont CX3CR1<sup>low</sup> (Figure. 21). Ces Mo produisent de l'IL-6, de l'IL-8, du CCL2 en réponse au LPS via le Toll like receptor (TLR) 4. Ils ont une forte activité de phagocytose, produisent une grande quantité de ROS et développent une réponse cytotoxique dépendante des anticorps (Connor et al., 1990). Ces Mo classiques assurent en première ligne, la défense de l'organisme contre les pathogènes et de nombreuses études montrent la présence précoce des Mo CD14+ dans les pathologies inflammatoires (Chuluundorj et al., 2014); (Reed-Geaghan et al., 2010).

### 3-2-1-1-2 Les monocytes CD14+CD16++: les monocytes non classiques

Les Mo non classiques sont de petites tailles, représentent 5 à 10 % des Mo circulants (Strauss-Ayali et al., 2007) et expriment un faible niveau de CD14 et un fort niveau de CD16. A l'inverse des Mo classiques, ils sont CX3CR1<sup>high</sup> et CCR2<sup>low</sup> (Figure. 22). Cette sous-population exprime de forts taux d'interleukine 1 récepteur antagoniste (IL-1Ra) en conditions physiologiques, possède une faible activité de phagocytose et ne produit que peu de ROS (Cros et al., 2010). En présence de LPS, ils ne synthétisent pas de TNF $\alpha$  ni d'IL-1 (Auffray et al., 2009).

### 3-2-1-1-3 Les monocytes CD14++CD16+: les monocytes intermédiaires

Une troisième population, initialement confondue avec les Mo non classiques a été observée en 1989 (Passlick et al., 1989) et représenterait 5 à 10 % des monocytes circulants. L'analyse par cytométrie en flux ne permet pas de bien discriminer les trois différentes populations mais plutôt un continuum en forme de banane (Figure 22) (Stansfield and Ingram, 2015).

En présence de LPS, ils produisent de l'IL-1, l'IL-6, de l'IL-8, du CCL3 mais également de l'IL-10 *in vitro* (Auffray et al., 2009). Ils possèdent une activité de phagocytose importante mais ne produisent pas de ROS. Les fonctions de ces Mo intermédiaires sont peu connues puisque la majorité des études cliniques ignorent cette population.

Les études sur les Mo restent très difficile *in vitro* compte tenu que ce sont des cellules de l'immunité, qui se différencient aux moindres stimuli de l'environnement et peuvent être activés pendant la purification. L'identification de leur homologues chez la souris a permis de les caractériser *in vivo*.

## 3-2-1-2 Les monocytes murins

La génération de souris GFP sous le promoteur du gène Cx3cr1 (Cx3cr1 kin GFP) chez la souris (Jung et al., 2000) a grandement facilité l'étude des Mo chez les murins. Ils sont identifiés en fonction de leur taille (FCS), de leur granulosité (SSC), de l'expression de CD115, CD11b, de la non expression de Ly6g (spécifiquement exprimés par les neutrophiles) et l'expression variable de Ly6c et Cx3cr1. Une étude a montré l'existence de deux populations, un premier sous-type appelé les Mo classiques ou inflammatoires

( $\text{Ly6c}^{\text{high}}$ ,  $\text{Cx3cr1}^{\text{low}}$  et  $\text{CCR2}^{\text{high}}$  représentant 50 % des Mo dans le sang) et un second sous-type les Mo non classiques ( $\text{Ly6c}^{\text{low}}$ ,  $\text{Cx3cr1}^{\text{high}}$  et  $\text{CCR2}^{\text{low}}$  représentant 50 % des Mo dans le sang) (Figure. 22) (Strauss-Ayali et al., 2007); (Soehnlein and Lindbom, 2010). Il a été proposé que la transition des Mo inflammatoires vers les Mo non classiques se fait dans la circulation (Sunderkotter et al., 2004).

Récemment, le dogme de la moelle osseuse comme unique réservoir de Mo a été remis en cause. En effet il a été montré que les Mo peuvent également provenir de la rate dans un modèle d'infarctus du myocarde (Swirski et al., 2009) (Figure. 23).

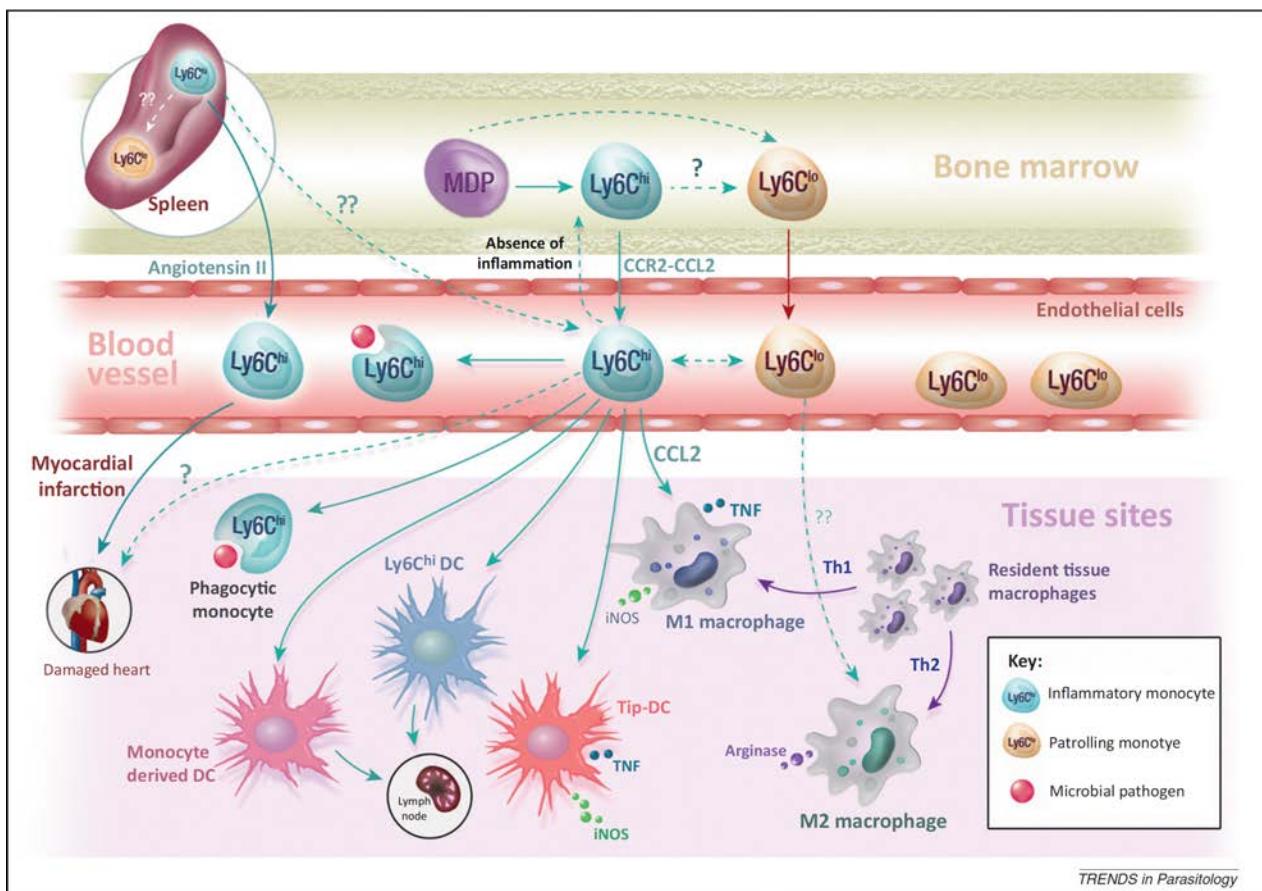


Figure 23: Schéma représentant les deux populations de monocytes chez la souris. Les Mo sont issus de la différenciation des précurseurs myéloïde commun (MDP). Les Mo  $\text{Ly6c}^{\text{low}}$  patrouillent le long des vaisseaux et les Mo  $\text{Ly6c}^{\text{high}}$  sont recrutés au niveau des sites inflammatoires.

La rate peut également être une source de Mo  $\text{Ly6c}^{\text{high}}$  lors d'un infarctus du myocarde. (Sheel, cell press, 2012)

### 3-2-1-2-1 Les monocytes inflammatoires (classiques)

Les Mo  $\text{Cx3cr1}^{\text{low}}$   $\text{CCR2}^{\text{high}}$  sont des cellules larges (de 10 à 14  $\mu\text{m}$  de diamètre). En conditions homéostatiques, les Mo inflammatoires circulent à travers les organes lymphoïdes et non lymphoïdes et ont une demi-vie d'un jour (Liu and Nussenzweig, 2010). En conditions pathologiques, ce sont eux qui sont recrutés au niveau du site de l'inflammation (Geissmann et al., 2003). En effet, tout comme leur homologues humains, les Mo inflammatoires murins expriment très fortement CCR2 ce qui leur permet de sortir de la moelle osseuse et d'aller vers le site d'inflammation (Figure. 23). Chez les souris déficientes en *Ccr2*, il a été observé une diminution de la proportion de Mo inflammatoires dans la circulation sanguine et inversement une augmentation du nombre dans la moelle osseuse (Serbina and Pamer, 2006). La déficience de l'axe CCL2/CCR2 empêche la mise en place d'une neuro-inflammation dans de nombreux modèles murins (Conductier et al., 2010); (Fife et al., 2000); (Sennlaub et al., 2013); (Grozdanov et al., 2014). Ces Mo inflammatoires sont présents dès la phase précoce de l'inflammation lors d'une infection (Shi and Pamer, 2011), lors d'un infarctus du myocarde (Nahrendorf et al., 2007). Ils ont une forte activité de phagocytose, produisent des ROS et des cytokines pro-inflammatoires comme  $\text{TNF}\alpha$  et  $\text{IL-1}\beta$  en réponse à une stimulation de TLR4 (Cros et al., 2010). Ils sont importants dans le processus d'élimination des pathogènes par phagocytose, et peuvent se différencier en cellules dendritiques en exprimant CD11c (dans l'élimination des débris nécrotiques) (Nahrendorf et al., 2007).

### 3-2-1-2-2 Les monocytes résidents (non classiques)

Les Mo résidents  $\text{Cx3cr1}^{\text{high}}$   $\text{CCR2}^{\text{low}}$  sont de plus petites cellules (de 8 à 12  $\mu\text{m}$  de diamètre). Ils ont une durée de vie plus longue que les Mo  $\text{Ly6c}^{\text{high}}$ . Ces Mo « patrouillent » le long des parois des vaisseaux sanguins (Figure. 23). Ces mouvements de patrouille sont différents du mouvement de « rolling » (ce sont des liaisons qui se forment et qui se rompent continuellement faisant ainsi ramper les Mo au niveau de la paroi endothéliale grâce aux récepteurs P selectin glycosylated ligand). En effet, la direction des mouvements de patrouille se fait indépendamment du flux sanguin grâce à la liaison du récepteur CX3CR1 (Auffray et al., 2007).

En conditions physiologiques, leur extravasation est rare et concerne moins de 1 % des Mo. Les fonctions de ces Mo  $\text{Ly6c}^{\text{low}}$  sont d'éliminer les lipides oxydés, les cellules mortes et les pathogènes (Shi and Pamer, 2011).

### 3-2-2 Différenciation des monocytes en macrophages

Les Mp sont des cellules de taille plus importante que les Mo (50 µm de diamètre). Ils ont de nombreuses fonctions comme l'élimination des cellules apoptotiques, la genèse et la résolution des réactions inflammatoires, le remodelage et la cicatrisation des tissus (Lawrence et al., 2002); (Gordon, 2007). Ces cellules possèdent une machinerie cellulaire (les lysosomes, les vacuoles de phagocytose, l'appareil de golgi) bien plus développée que les Mo, ce qui leur permet d'avoir une meilleure migration, phagocytose et production de cytokines.

L'hétérogénéité morphologique et fonctionnelle des macrophages a été longuement décrite (Mantovani et al., 2002); (Geissmann et al., 2010). Face à cette plasticité (capable de se polariser en fonction de son environnement), une nomenclature a été définie par analogie avec les lymphocytes Th1 et Th2: les Mp de type M1 (classiques) de nature pro-inflammatoire, qui possèdent une activité anti-bactérienne et sont impliqués dans la mise en place de la réaction inflammatoire contre les pathogènes (Allavena and Mantovani, 2012) et les Mp de type M2 qui sont plutôt impliqués dans la réparation et le remodelage tissulaire (Figure. 24) (Martinez et al., 2008).

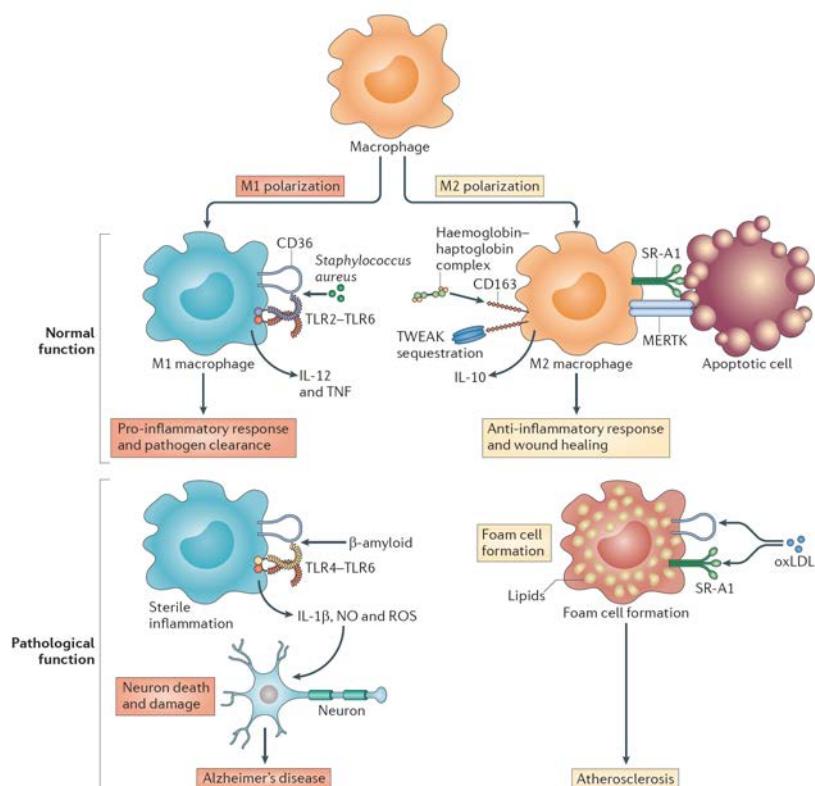


Figure 24: Schéma représentant la polarisation des macrophages.

**Les Mp constituent une population très hétérogène qui peut être catégorisée en Mp de type M1 et M2.**

(Canton, nature review immunol, 2013)

Les Mp résidents (par opposition aux Mp issus de l'infiltration des Mo) colonisent les organes au cours de l'embryogenèse et sont capables en conditions physiologiques de se renouveler (Gordon and Taylor, 2005) (Figure. 25). Ils se différencient en cellules de Kupffer dans le foie (Crofton et al., 1978), en CM dans le cerveau (Saijo and Glass, 2011) ou en ostéoclastes dans les os (Udagawa et al., 1990) (Figure. 25). Ils sont la première ligne de défense d'un tissu. Une étude a montré que dans certains cas d'inflammation, l'augmentation locale du nombre de Mp n'est pas forcément due à un recrutement *via* la circulation mais plutôt à une prolifération locale (Jenkins et al., 2011).

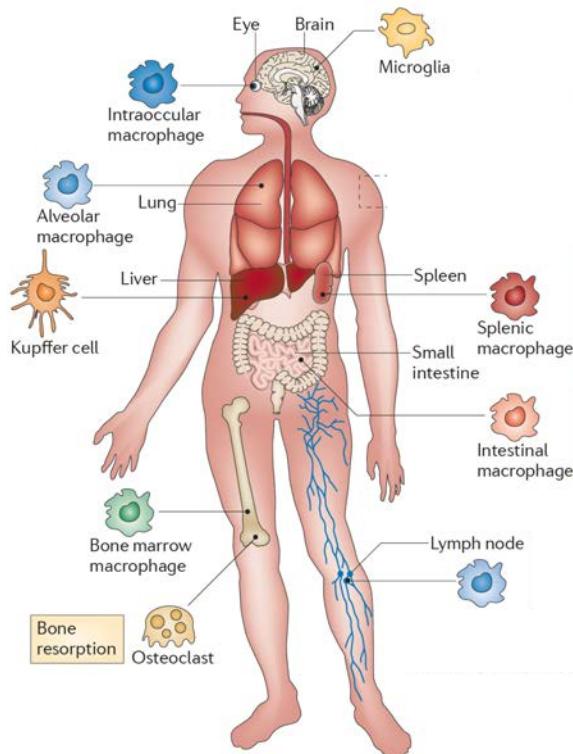


Figure 25: Schéma représentant la diversité des macrophages résidents.  
(Murray, nature review, 2011)

### 3-2-2-1 Les macrophages M1

Les Mp de type M1 sont des cellules effectrices spécialisées dans la destruction des microorganismes. Ils sont caractérisés par une importante capacité d'élimination des pathogènes intracellulaire (Mosser and Handman, 1992). Ils sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires comme TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-12 (Martinez and Gordon, 2014) ainsi que des ROS. La polarisation de ces Mp est influencée par l'environnement cytokinique. Ainsi, *in vitro*, les Mp M1 sont induits par l'IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  et LPS. Ils produisent également de l'IL-12 et

l'IL-23 qui induisent la polarisation lymphocytaire vers un phénotype Th1 (Mantovani et al., 2002). En cas d'inflammation chronique, ils sont responsables de la destruction tissulaire.

### 3-2-2-2 Les macrophages M2

Les Mp de type M2 (anti-inflammatoires ou alternatifs) produisent des cytokines anti-inflammatoires comme IL-1Ra, IL-10, CD206 et des récepteurs scavengers (Martinez et al., 2008). Ces Mp M2 sont induits par des cytokines anti-inflammatoires comme IL-4, IL-10 TGF $\beta$  *in vivo* et *in vitro* (Mantovani et al., 2005). Ils jouent un rôle primordial dans la réponse de type Th2 et sont impliqués dans le remodelage et la réparation tissulaire. Les Mp M2 expriment fortement les récepteurs du mannose, du galactose, et de l'arginase qui sont associés à l'expression de l'IL-1Ra (Dinarello, 2005).

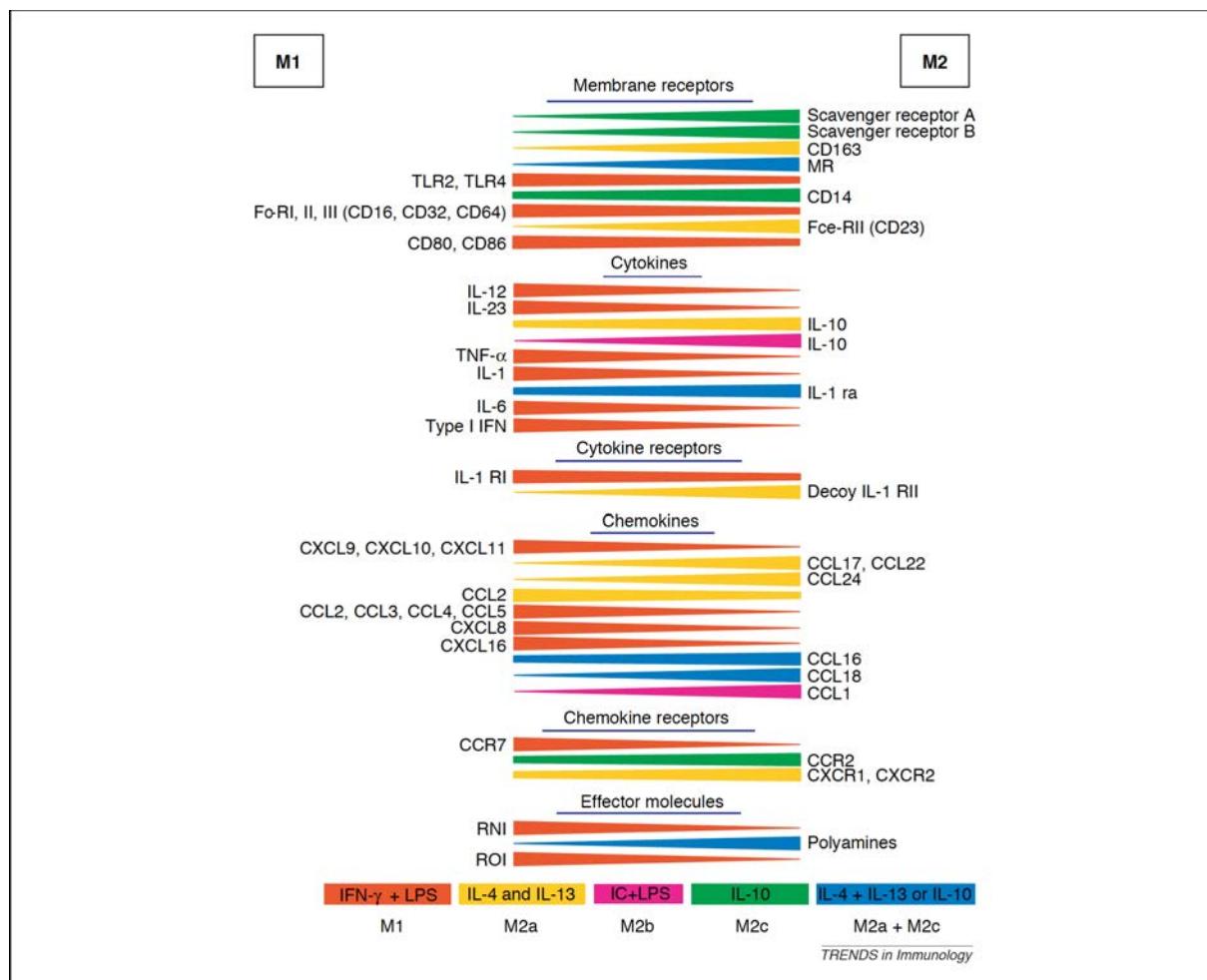


Figure 26: La plasticité et le continuum moléculaire de l'expression des marqueurs entre les profils extrêmes M1 à M2.  
(Mantovani, trends in immunol, 2004)

Toutefois, la nomenclature est entrain de vivre un véritable tournant, en ne se limitant plus qu'aux Mp de type M1 ou M2 mais en prenant compte un spectre beaucoup plus large de leurs états d'activation. La polarisation M1/M2 ne doit être vue que comme une simplification conceptuelle permettant de décrire le continuum d'activation qui existe entre les extrêmes (Figure. 26).

La perte de l'équilibre entre les Mp de types M1 et M2 peut aboutir à des processus pathologiques. L'excès d'activation des Mp M1 induit des maladies inflammatoires chroniques tandis que l'excès d'activation des Mp M2 induit une immunosuppression forte.

### 3-2-2-3 Lien entre les Mo et les Mp

Des chercheurs se sont intéressés à savoir si l'hétérogénéité des Mo avait un lien avec la génération des populations macrophagiques. Les Mo inflammatoires initient une différenciation en Mp M1 en surexprimant des facteurs de transcription RelB et PU.1 (Auffray et al., 2007), alors que les Mo non classiques en réponse à un même pathogène se différencient en Mp M2 en exprimant cMaf et MafB, l'arginase et CD206. Il a été montré chez les souris déficientes en *Ccr2* dans un modèle d'obésité, l'absence des Mp M1 dans les tissus adipeux mais toujours la présence des Mp M2. Tandis que chez les souris contrôles avec ce même modèle, la présence majoritaire des Mp M1 est observée au niveau des tissus adipeux. Ces auteurs concluent que les Mp M1 et M2 dérivent respectivement des Mo inflammatoires et non-classiques. Cependant dans certaines conditions les Mo inflammatoires peuvent se différencier en Mp de type M2 anti-inflammatoire en stimulant la réparation tissulaire dans un modèle de lésion du muscle squelettique (Arnold et al., 2007). En conclusion, les Mo inflammatoires en conditions pathologiques se différencient en Mp de type M1, même si dans certains modèles ces Mo peuvent se différencier en Mp de type M2.

### 3-2-3 Microglies

Les CM sont considérées comme les Mp résidents du SNC et représentent 5 à 20 % des cellules du SNC (Ransohoff and Cardona, 2010). Comme les autres Mp tissulaires, les CM sont spécialisées dans la surveillance immunitaire locale mais présentent également certaines spécificités les distinguant des autres populations de PM. Une des particularités des CM est leur morphologie étoilée avec des longs prolongements (Figure. 27) leur permettant de sonder en permanence l'ensemble du parenchyme, afin de détecter toute entrée de pathogène ou dysfonctionnement cellulaire (Nimmerjahn et al., 2005).

Rio Horteg a été le premier à décrire les CM dans le SNC et les a classé comme une population distincte des neurones et des astrocytes (Somjen, 1988).



Figure 27: Schéma représentant la forme quiescente et la forme activée (amiboïde) des CM dans le SNC.

En conditions homéostatiques, les CM présentent une morphologie étoilée avec des longs prolongements leur permettant de sonder en permanence l'ensemble du parenchyme, afin de détecter toute entrée de pathogène ou dysfonctionnement cellulaire. Lorsque les CM sont activées, elles perdent progressivement leurs prolongements cytoplasmiques ce qui s'accompagne d'une hypertrophie de leurs corps cellulaires.

(modifié à partir de Karperien, frontiers, 2013)

### 3-2-3-1 Origines

L'origine des CM est toujours sujette à controverse, du fait de l'absence de marqueurs spécifiques permettant de les identifier sans ambiguïté. Ils pourraient être d'origine mésodermale, neuroectodermale ou hématopoïétique. Les choses se sont précisées lorsqu'une équipe a montré que les CM pourrait avoir une origine extra-embryonnaire et mésodermale (Ginhoux et al., 2010); (Kierdorf et al., 2013). Les CM proviendraient des progéniteurs des sacs vitellins, les progéniteurs erythromyéloïdes (Figure. 21). Ces progéniteurs envahiraient le tube neural après quelques jours de développement embryonnaire, avant même la mise en place du réseau vasculaire.

L'ensemble des données de la bibliographie semble montrer que les CM ne possèdent pas qu'une origine. Au cours du développement, les CM dérivées des précurseurs mésodermiaux coloniseraient la totalité du SNC. Ces CM formeraient un pool de cellules extrêmement stable.

Des expériences *in vivo* d'injection de BrdU (agents s'incorporant dans l'ADN nouvellement synthétisé des cellules en prolifération) chez les souris normale montrent que très peu de cellules sont positives pour le BrdU dans la rétine (Xu et al., 2007). La prolifération des CM au sein de la rétine est donc très limitée en conditions physiologiques. Le renouvellement du pool microglial se ferait grâce aux cellules myéloïdes venant de la circulation sanguine (Kaneko et al., 2008); (Xu et al., 2007).

### 3-2-3-2 Principales fonctions

Au cours du développement, les CM présentent tout d'abord une morphologie amiboïde au moment de la colonisation puis adoptent progressivement une structure ramifiée (Ling and Wong, 1993).

La première intervention de la CM est son implication dans la neurogenèse. Après la naissance, le développement de la rétine n'est pas terminé chez la plupart des mammifères. Il existe une surproduction de cellules ganglionnaires et une grande partie des neurones générés disparaissent (Li et al., 2015). Ce remodelage par mort cellulaire participe à l'ajustement des connections neuronales. Lors du développement, la fonction principale des CM est de phagocytter et d'éliminer les corps cellulaires des neurones dans la CNI et la CCG. Elles jouent également un rôle essentiel dans le guidage, l'orientation et la maturation des synapses au cours du développement post-natal chez la souris (Bilimoria and Stevens, 2015); (Kettenmann et al., 2013).

Par ailleurs, leur apparition avec les vaisseaux sanguins au cours du développement suggèrent qu'elles pourraient aussi intervenir dans le guidage et dans la mise en place du système vasculaire dans le SNC (Arnold and Betsholtz, 2013); (Pennell and Streit, 1997); (Fantin et al., 2010).

A l'âge adulte, les CM ramifiées sont qualifiées de quiescentes mais sont loin d'être inactives. Ces cellules quiescentes sont caractérisées par une faible expression de CD45 et quasiment pas d'expression de CMH II (Carson et al., 1998). Ces cellules peuvent être activées à la moindre perturbation détectée dans le tissu (Ladeby et al., 2005).

-Les CM jouent un rôle primordial dans la phagocytose. Les CM sont recrutées vers les pathogènes à phagocytter en détectant l'ATP relargué par les neurones endommagés *via* leur récepteurs ionotropiques P2X- et métabotropiques P2Y- puis elles adhèrent grâce à des récepteurs de surface comme les récepteurs d'épuration de type SR-A et les récepteur au complément CR3 (Reichert and Rotshenker, 2003); (Davalos et al., 2005). L'adhérence

est facilitée par l'opsonisation des pathogènes ou des facteurs du complément. Les CM sont moins efficaces pour phagocytter les Mp en périphérie (Mosley and Cuzner, 1996).

-Les CM participent à l'établissement de la réponse adaptative notamment par leur capacité de présentation antigénique par l'expression des molécules de CMH de classe II lors de leur activation. Elles expriment également des molécules de costimulation de type B7 nécessaires à une activation des lymphocytes (profil Th1, Th17 ou Th2) (Frei et al., 1987); (Hetier et al., 1988); (Hickey and Kimura, 1988).

-Elles participent également à l'amplification de la réponse immunitaire innée (activation aigüe) par l'intermédiaire de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. En cas d'inflammation, elles sécrètent une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires qui peuvent avoir des effets bénéfiques comme néfastes. IL-1 est fortement produit par les CM lors d'une inflammation (Davies et al., 1999), qui induit la production de TNF $\alpha$  ou encore d'IL-6 (Basu et al., 2004).

### 3-2-3-3 Activation des CM (à long terme)

Une des principales caractéristiques des CM est leur capacité à s'activer très rapidement en réponse à un stress (Rock et al., 2004) que ce soit lors d'une ischémie cérébrale (Stoll et al., 1998), lors de maladies dégénératives (Ransohoff, 2009) ou d'infections bactériennes (Olson et al., 2001). L'activation des CM est associée à toutes les pathologies du SNC (Block and Hong, 2005); (Madeira et al., 2015); (Santiago et al., 2014); (Langmann, 2007).

Plusieurs mécanismes concourent à l'activation:

-Les neurones maintiennent les CM dans leur état quiescent *via* l'expression de CD200, de TGF $\beta$ , de prostaglandine E2 ou encore *via* CX3CL1 (exprimée constitutivement par les neurones) et CX3CR1 (exprimées par les CM) (Figure. 28). La perte de ces interactions entraîne l'activation des CM (Broderick et al., 2002); (Saijo and Glass, 2011); (Ransohoff and Cardona, 2010). Les CM tentent de protéger les neurones lésés en favorisant leur réparation par la sécrétion de facteurs neurotrophiques (Streit, 2002b). En cas d'échec, l'inflammation se poursuit et les CM atteignent un stade d'activation plus important susceptible de conduire à une inflammation chronique (Langmann, 2007); (Santiago et al., 2014); (Madeira et al., 2015). Elles perdent progressivement leurs prolongements cytoplasmiques ce qui s'accompagne d'une hypertrophie de leur corps cellulaire (Figure 27). Elles vont exprimer plus fortement CD11b, CD45 et les CMH I, II.

-Les CM peuvent être activées par de nombreux signaux (Langmann, 2007) comme les cytokines, les facteurs du complément, les protéines plasmatiques, les motifs associés aux bactéries ou virus, l'ATP libéré par les neurones endommagés (Figure. 29).

La diversité des récepteurs exprimés par les CM explique le grand nombre de stimuli capable d'activer les CM. Elles expriment tous les récepteurs TLR capable de reconnaître les virus, les bactéries, les parasites (Pasare and Medzhitov, 2004), les récepteurs purinergiques permettant de détecter l'ATP extracellulaire (Inoue, 2002), les récepteurs du complément (Rotshenker, 2003), les récepteurs aux cytokines comme IFN, TNF, IL-1 (Yenari et al., 2010) ou encore le récepteur TREM 2 qui est impliqué dans la phagocytose (Takahashi et al., 2007).

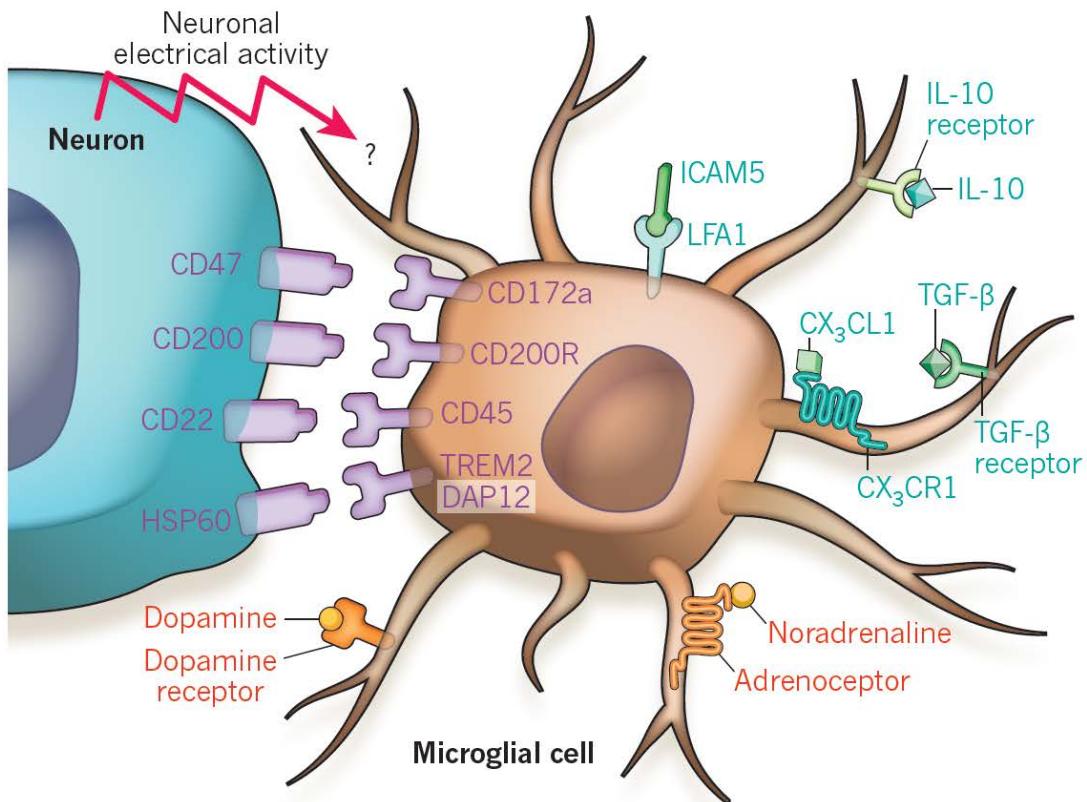


Figure 28: Interactions entre le neurone et la cellule microgliale.  
 Les neurones inhibent l'activation des CM de plusieurs manières. Elles peuvent inhiber les CM par contact cellule-cellule comme indiqué en violet. Les cytokines solubles inhibitrices ou les molécules d'adhésion et leurs récepteurs sont montrés en bleu, et les neurotransmetteurs et leurs récepteurs sont indiqués en rouge.  
 (Ransohoff, nature, 2010)

-Les CM peuvent évoluer en dehors de toute pathologie avec l'âge vers un phénotype et une morphologie altérés. Ces CM dites « dystrophique » présentent une morphologie hypertrophiée (Streit et al., 2004). Elle s'accompagne d'une expression plus importante de marqueurs d'activation comme le CMH II, ICAM, CD86 (Lynch, 2009), produisent plus de TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$  et une diminution de TGF $\beta$  et IL-10 (von Bernhardi et al., 2010).

Dans la rétine, le nombre de CM augmente avec l'âge chez les souris. Ces CM ont une vitesse d'extension et de rétraction plus lente, elles perdent leur faculté à migrer et ont tendance à s'accumuler au cours du vieillissement, même au niveau de l'espace sous-rétinien, ce qui suggère une diminution de la capacité de surveillance de l'environnement (Xu et al., 2008); (Xu et al., 2009). Ces données montrent que ces CM sénescantes contribueraient à créer un environnement propice à une inflammation chronique au cours du vieillissement ce qui peut favoriser les pathologies liées à l'âge.

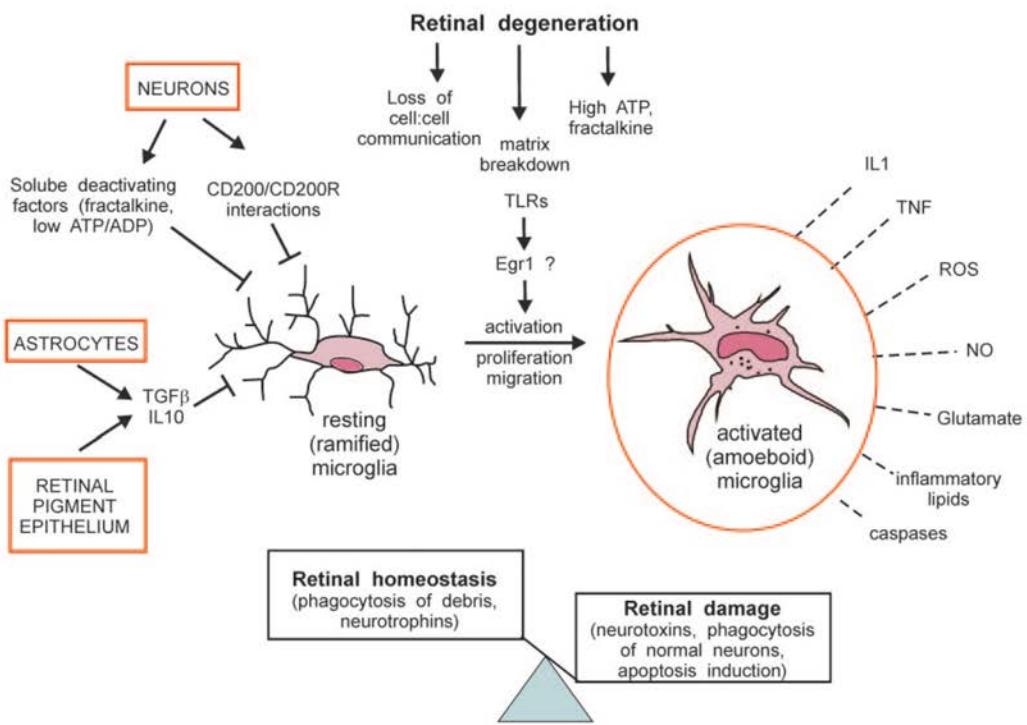


Figure 29: Schéma représentant les différents signaux qui induisent l'activation des cellules microgliales.

Les CM ramifiées sont gardées dans un état quiescent pour réguler l'homéostasie rétinienne grâce aux contacts cellulaires et aux facteurs libérés par les neurones, les astrocytes et l'EPR. Plusieurs éléments peuvent déclencher la dégénérescence rétinienne et mener à l'activation, la prolifération et à la migration microgliale. Les microglies activées sécrètent différents facteurs bioactifs menant à une réponse exagérée des microglies puis à une lésion rétinienne.

(d'après Langmann, j leukocyte biology, 2007)

## IV- DMLA et inflammation

### 4-1 Privilège immun de l'œil

Le SNC doit en permanence mettre en balance le risque lié à une infection et le risque lié au déclenchement d'une réaction inflammatoire susceptible d'endommager les neurones. Les neurones constituent effectivement une population de cellules extrêmement différenciées ayant perdu la capacité à se renouveler. L'œil est un site immunologique privilégié, aussi bien au niveau de la chambre antérieur, que dans le vitré ou encore dans l'espace sous-rétinien. Ce statut immunologique très particulier de l'œil est dû, d'une part à des caractéristiques anatomiques (la présence de la barrière hémato-rétinienne (BHR), l'absence d'un drainage lymphatique conventionnel) et d'autre part à des nombreux facteurs cellulaires et moléculaires qui limitent les réponses immunitaires.

#### 4-1-1 Barrière hémato-rétinienne

La BHR isole le tissu oculaire des facteurs diffusibles portés par la circulation sanguine (Morcos et al., 2001). Cette imperméabilité est principalement due aux cellules endothéliales qui forment des jonctions serrées. A cette paroi vasculaire s'ajoute la lame basale de l'endothélium, les péricytes et les nombreux pseudopodes des astrocytes et les cellules de Müller qui contribuent à l'intégrité de l'étanchéité de la barrière et à la défense immunitaire. De même, au niveau de la rétine externe, la présence de jonctions serrées entre des cellules de l'EPR contribue à former la BHR externe. Cependant, la présence de la BHR seule ne suffit pas pour empêcher l'extravasation des leucocytes dans des modèles d'inflammation rétinienne (Xu et al., 2005).

La membrane limitante interne constituée des pieds des cellules gliales de Müller définit la frontière entre la rétine et le vitré (constitue la première barrière physique de la rétine depuis le vitré).

#### 4-1-2 Facteurs cellulaires et moléculaires

De nombreux facteurs cellulaires et moléculaires qui limitent les réponses immunitaires des cellules résidentes et la survie et l'activation des cellules infiltrantes:

-L'EPR sécrète une grande quantité de facteurs immunosuppresseurs tels que les neuropeptides  $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone) (Taylor, 2007), la somastatine

(Taylor, 2003), le peptide vasoactif intestinal (Stein-Streilein, 2013); (Ng et al., 2007), le TGF $\beta$  (Kriegel et al., 2006); (Li et al., 2006) et les inhibiteurs du complément (Goslings et al., 1998).

-Les CM sont les seules cellules immunitaires résidentes de la rétine (localisées uniquement dans la rétine interne) à l'exception de quelques cellules dendritiques (Santos et al., 2008); (Forrester et al., 2010). Les neurones maintiennent ces CM dans leur état quiescent *via* l'expression de nombreuses molécules (chapitre 3-2-3-2). L'absence de PM en conditions physiologiques et de vaisseaux sanguins dans la couche des PR préserve les PR en cas d'inflammation. La faible expression de CMH II par les CM en conditions homéostatiques réduit également la présentation d'antigène (Nikodemova et al., 2006).

-Les corps ciliaires, l'iris et la rétine sont capables d'induire la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes T régulateurs pour inhiber l'inflammation induite par les Th1 et les Th2 (Stein-Streilein, 2008).

-L'EPR joue un rôle primordial dans le maintien du privilège immun au niveau de la rétine externe (Stein-Streilein, 2013) en produisant principalement du TGF $\beta$  et en exprimant FasL. Le TGF $\beta$  est l'un des facteurs impliqué dans le privilège immun le mieux étudié. Il est capable d'inhiber l'expression des cytokines pro-inflammatoires aussi bien *in vitro* que *in vivo* (Zamiri et al., 2005); (Ng et al., 2009). Ce médiateur est activé par la thrombospondine-1 (TSP-1) qui est également produit par l'EPR (Zamiri et al., 2005). La déficience en TSP-1 réduit fortement la quantité de TGF $\beta$  actif ce qui induit une inflammation sous-rétinienne due à une accumulation des PM après une lésion rétinienne (Zamiri et al., 2005); (Ng et al., 2009). L'autre principal médiateur immunosupresseur est FasL, qui est un puissant inducteur de l'apoptose des leucocytes (Streilein et al., 2002). FasL est une protéine transmembranaire de la famille du TNF $\alpha$ . L'activation de cette dernière, conduit à une fragmentation de l'ADN dans les lymphocytes T qui expriment le récepteur Fas (Brunner et al., 1995). De même, on peut noter que les PM (CM, Mp et Mo) expriment également ce récepteur et sont donc sensibles à la mort par apoptose induite par FasL (Mangan et al., 1991); (Levy et al., 2015).

## 4-2 Inflammation dans la DMLA

La nature précise du facteur qui va déclencher la pathologie chez les patients DMLA n'est pas encore bien comprise. De nombreuses hypothèses ont été avancées telles que l'ischémie, le stress oxydant et les facteurs génétiques. Néanmoins, comme dans d'autres pathologies neuro-dégénératives incluant la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, l'inflammation, remise à l'honneur grâce aux études histopathologiques et génétiques, pourrait jouer un rôle crucial dans la mise en place de la physiopathologie de la DMLA (Parmeggiani et al., 2012); (Patel and Chan, 2008).

Cette partie va détailler les différents acteurs de l'inflammation qui pourraient être responsable de la mise en place de la pathologie de DMLA.

### 4-2-1 Les changements biologiques et histologiques

De nombreux changements biologiques et histologiques surviennent lors du vieillissement et sont susceptible d'induire une inflammation chronique.

D'une part, le stress oxydatif quotidien produit par l'exposition à la lumière et la phagocytose conduit avec l'âge à une accumulation de dégâts cellulaires et de produits oxydés très inflammatoires. D'autres part, toujours avec l'âge on observe une augmentation de la MB et une diminution de la choriocapillaire (chapitre 2-4-2). Ces modifications pourraient rendre les PR, qui sont des cellules très consommatrices d'énergie, dysfonctionnelles et entraîner leur perte ce qui déclencherait ainsi une neuro-inflammation (Bhutto and Lutty, 2012).

### 4-2-2 Drusen

Les drusen contiennent de nombreuses molécules de l'inflammation notamment des immunoglobulines (Johnson et al., 2000), des plaques  $\beta$ -amyloïdes, de la vitronectine, des cellules dendritiques (Hageman et al., 2001), des protéines plasmatique qui sont impliquées dans la phase aigüe de l'inflammation comme la protéine réactive C (CRP) (Anderson et al., 2002), l' $\alpha$ -antichymotrypsine (Johnson et al., 2000) et l'amyloïde P (Johnson et al., 2000), Apo E (Anderson et al., 2002), de nombreux facteurs du compléments (Telander, 2011); (Augustin and Kirchhof, 2009); (Johnson et al., 2000); (Patel and Chan, 2008).

Il a été proposé que l'inflammation chronique des cellules de l'EPR pourraient altérer progressivement leur fonction et aboutir ainsi à la formation de drusen (Telander, 2011); (Augustin and Kirchhof, 2009). Cependant il n'est pas clairement établit si l'inflammation observée est une conséquence ou la cause de l'altération des cellules de l'EPR.

### 4-2-3 Le complément

Les analyses protéomiques de drusen ont confirmé l'implication du système du complément (C1q, facteur B, C3, C5) (Girmens et al., 2012), de nombreuses publications ont montré depuis, le rôle crucial du complément dans la pathogénèse de la DMLA. En effet, de nombreux polymorphismes du complément sont associés à un risque plus fort de développer une DMLA tels que *K155Q* et *R102G* du gène *C3* et *P167S* du gène *C9* (Seddon et al., 2013). Cependant, certains polymorphismes comme *L9H* du gène *complement factor B* et *E318D* du gène *C2* diminuent le risque de développer une DMLA (McHarg et al., 2015); (Kawa et al., 2014).

Les protéines du complément constituent une des premières lignes de défense de l'organisme contre les éléments pathogènes. Ces protéines jouent un rôle dans l'opsonisation des particules étrangères, dans la destruction des cellules cibles et dans le recrutement des cellules inflammatoires (Patel and Chan, 2008). Il existe trois voies d'activation du complément: la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines. Il est essentiel que les cellules de l'hôte soient protégées de l'activation de la voie alterne afin de prévenir les maladies auto-immunes. Cette régulation se fait *via* l'expression de protéines qui inhibent l'action du complément. Parmi ces protéines figure le facteur H du complément (CFH) qui est une protéine plasmatique synthétisée par le foie. Le CFH protège les cellules du soi de l'activation de la voie alterne du complément (Figure. 30). Dans la rétine, en conditions physiologiques, le CFH est exprimé par les cellules de l'EPR et par les CM (Hageman et al., 2005). La mutation *Y402H* (ce variant est responsable à plus de 40 % des cas de DMLA) altère la fonction du CFH et entraînerait une activation de la voie alterne au niveau de l'EPR et de la choroïde (Skerka et al., 2007). Ceci pourrait être la cause d'une inflammation chronique responsable de la dégénérescence des cellules de l'EPR et la formation des drusen.

Cependant dans notre laboratoire, il a été montré que l'absence du CFH pourrait être bénéfique dans nos modèles de souris de DMLA. En effet, notre laboratoire a montré que la délétion du CFH dans les souris déficientes en *Cx3cr1* inhibe l'accumulation des PM sous-rétiniens avec l'âge et avec le modèle d'illumination. Le CFH est fortement exprimé par les PM et le polymorphisme *Y402H* entraînerait une moins bonne fixation du CFH sur son récepteur. Ces PM sont ainsi plus exposés au complément. Ces données suggèrent que l'absence de CFH au niveau des PM permettrait une accumulation moindre de PM dans l'espace sous-rétinien ce qui empêcherait la perte des PR (travaux en cours).

De nombreuses molécules qui permettent de moduler l'activité du complément sont actuellement en cours d'essais clinique pour le traitement de la DMLA (Troutbeck et al., 2012).

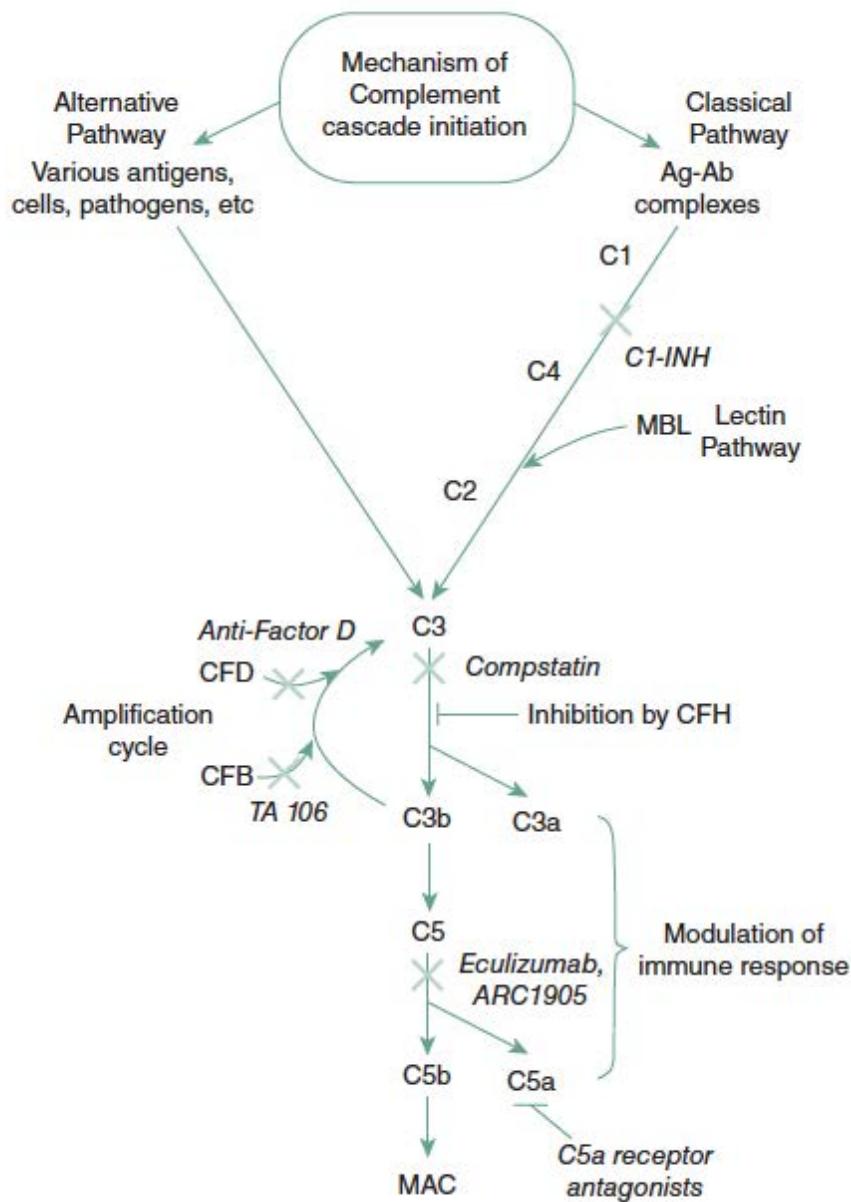


Figure 30: La voie du complément montrant les différents mécanismes d'activation et les inhibiteurs thérapeutiques.

CFB: Complement factor B; CFD: Complement factor D; CFH: Complement factor H; MAC: Membrane attack complex  
 (Troutbeck, Clinical and Exp Ophthal, 2012)

Pot-4 (Compstatin) a été le premier inhibiteur du complément à être évalué pour le traitement de la DMLA pour les deux formes. C'est un peptide cyclique qui empêche le clivage du C3 en C3a et C3b (Figure. 30). Ce peptide est administré par voie intravitréenne et ne présente pas toxicité même à de fortes doses chez les modèles animaux (phase I des essais cliniques a été achevés). ARC1905 est un autre inhibiteur du complément, qui empêche le clivage du complément C5 en C5a et C5b. Cet inhibiteur est testé pour traiter les 2 formes tardives de la DMLA (en phase I des essais cliniques). L'Eculizumab est un anticorps anti-C5 qui est traité pour la forme géographie. Cet anticorps est administré par voie intraveineuse (en phase II des essais cliniques) (Troutbeck et al., 2012). Cependant la phase II n'a pas réussi à démontrer une efficacité significative. Et enfin, le Lampalizumab est un anticorps monoclonal anti-facteur D utilisé dans le traitement de l'atrophie géographique. En phase II, il a été montré une réduction de la zone atrophique de 20 %. Un essai clinique en phase III est actuellement en cours pour les patients ayant une DMLA atrophique.

#### 4-2-4 Marqueurs plasmatiques

Certains marqueurs plasmatiques inflammatoires ont été associés à la DMLA. Une étude a montré que le taux de CRP était significativement augmenté chez les patients atteints de DMLA (Seddon et al., 2004). Il se peut que ce taux élevé soit dû à une anomalie du CFH (polymorphisme Y402H) qui ne se lierait plus de façon optimale à la CRP (Seddon et al., 2004). De même que la CRP, le taux de l'IL-6 (Seddon et al., 2005); (Klein et al., 2008) est associée à la progression de la DMLA. D'autres molécules telles que la protéine ICAM-1, le fibrinogène et la vitronectine ont également été associées à la DMLA (Schaumberg et al., 2007); (Johnson et al., 2000). Par ailleurs, il a été observé chez des patients atteints de DMLA, la présence d'anticorps dirigés contre les astrocytes ainsi que les cellules de l'EPR ce qui conforte l'implication de l'inflammation (Johnson et al., 2001); (Anderson et al., 2002).

#### 4-2-5 Inflammation sous-rétinienne

De nombreuses études anatomopathologiques ont mis en évidence la présence de cellules inflammatoires dès le stade précoce de la DMLA qui précède l'apparition de lésions rétiniennes (Gupta et al., 2003); (Cruz-Guilloty et al., 2013); (Chinnery et al. 2012). Dans la forme atrophique, des PM sont présents au bord des zones atrophiques et sont responsables de la dégénérescence des PR (Sennlaub et al., 2013); (Gupta et al., 2003). Dans la forme néovasculaire, les PM interviennent dans la dégradation de la MB, permettant la migration des néovaisseaux dans l'espace sous-rétinien (Lopez et al., 1991);

(Grossniklaus et al., 2002) mais également dans la formation de ces néovaisseaux *via* l'expression du VEGF (Nishimura et al., 1990); (Oh et al., 1999); (Sakurai et al., 2003).

Par ailleurs, avec l'âge, les CM tendent à prendre un phénotype activé (moins de ramifications) et une morphologie de plus en plus hypertrophiée chez les personnes âgées (Streit et al., 1999). De même, il semblerait que le privilège immun ne soit plus aussi performant, ce qui pourrait conduire à une inflammation chronique qui serait associée à une dégénérescence rétinienne (Gupta et al., 2003); (Sennlaub et al., 2013).

De manière intéressante, on peut observer le même phénomène chez les souris âgées. En effet, au cours du vieillissement, le nombre de CM augmente significativement chez les souris de 18 à 24 mois dans la rétine interne (Damani et al., 2011). Ces souris montrent également une efficacité moindre pour éliminer ces cellules immunitaires dans la rétine externe et s'accumulent par conséquent dans l'espace sous-rétinien (Damani et al., 2011); (Xu et al., 2008). Ces changements morphologiques s'accompagnent d'une expression plus importante de marqueurs inflammatoires tels que CMH II, ICAM, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  (Lynch, 2009); (von Bernhardi et al., 2010). Ceci pourrait donc contribuer à créer un environnement favorable à une inflammation chronique au cours du vieillissement en recrutant des Mo inflammatoires de la circulation sanguine (Streit, 2002a); (Tanaka et al., 2003); (Vallieres and Sawchenko, 2003).

La présence prolongée de ces PM dans l'espace sous-rétinien peut endommager les neurones en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) et conduire à une dégénérescence rétinienne (Njie et al., 2012). Les différents polymorphismes impliqués dans la DMLA (comme Apo E, CFH) pourraient jouer un rôle au niveau ces PM en induisant un phénotype pro-inflammatoire dans l'espace sous-rétinien. Ces polymorphismes pourraient également jouer un rôle au niveau de la survie de ces PM dans l'espace sous-rétinien en devenant résistants à l'apoptose induite par l'EPR (Levy et al., 2015).

Toutes ces données montrent le rôle de l'inflammation et de l'immunité dans la pathogenèse de la DMLA aussi bien chez l'humain que chez les modèles animaux. L'hypothèse qu'une inflammation sous-rétinienne puisse être le facteur déclenchant dans la mise en place de la dégénérescence rétinienne est de plus en plus suspectée (Kohno et al., 2013); (Guo et al., 2012). Même si des travaux supplémentaires seront nécessaires pour déterminer précisément la chronologie de la pathologie.

## 4-2-6 Modèles d'inflammation sous-rétinienne

Il est très difficile de trouver le bon modèle pour étudier la pathologie de la DMLA, qui est une pathologie multifactorielle (génétique, inflammation, environnementale). De nombreux modèles d'inflammation sous-rétinienne présentent des symptômes similaires à l'homme et peuvent apporter des éléments de réponse préliminaire pour mieux comprendre cette pathologie. Les souris ne possèdent pas de macula, ni de fovéa. La répartition de leurs PR est assez homogène sur toute la surface de leur rétine. Cependant comme nous l'avons déjà évoqué, les dégénérescences observées lors de la DMLA commencent en zone péri-fovolaire par une perte des bâtonnets (chapitre 2-4-2). Dans cette zone, les rétines murines et humaines présentent de grandes similitudes et il est vraisemblable que les mécanismes de dégénérescence impliqués soient identiques dans les modèles murins et dans la pathologie humaine.

### 4-2-6-1 Modèle de souris *Abca4<sup>-/-</sup> Rdh8<sup>-/-</sup>*

La souris *Abca4<sup>-/-</sup> Rdh8<sup>-/-</sup>* présente les mêmes caractéristiques que la pathologie de la DMLA chez l'homme. Kohno et son équipe (Kohno et al., 2013) ont montré une accumulation de PM dans l'espace sous-rétinien suivie d'une dégénérescence progressive des PR avec l'âge (ou avec le modèle d'illumination), la présence de drusen, de lipofuscine et de néovaisseaux choroïdiens. Cela est initié par un défaut de phagocytose du *all-trans*-rétilal chez ces souris *Abca4<sup>-/-</sup> Rdh8<sup>-/-</sup>* ce qui va provoquer un recrutement de PM de la circulation sanguine qui vont sécréter une grande quantité de cytokines pro-inflammatoire (CCL2, IL-1 $\beta$  et TNF). Même si initialement le recrutement de cellules inflammatoires peut être bénéfique pour phagocytter les débris, la présence prolongée de ces PM conduit à une inflammation chronique et à une dégénérescence importante des PR. En effet, l'accumulation des PM dans l'espace sous-rétinien et la mort des PR peuvent être inhibées par l'administration de CL2MBP-liposome qui élimine des PM circulants ou par l'administration de Minocycline qui inhibe l'activation des PM. Cette étude montre clairement le rôle délétère des PM qui sont recrutés dans l'espace sous-rétinien.

### 4-2-6-2 Modèle de souris immunisées par du carboxyethylpyrrole (CEP)

Cruz-Guilloty et son équipe ont montré également un rôle primaire de l'inflammation sous-rétinienne dans la mise en place de la pathologie de DMLA en utilisant un modèle de souris immunisées par du carboxyethylpyrrole (CEP) qui est un peptide formé à partir de l'oxydation

d'un acide gras polyinsaturé, l'acide docosahexaénoïque. Le CEP est retrouvé en quantité augmentée dans le plasma des patients atteints de DMLA et dans les drusen. Ces auteurs ont montré que les souris immunisées par du CEP présentent une dégénérescence des PR causée par une accumulation primaire des PM dans l'espace sous-rétinien *via* le recrutement CCL2/CCR2 (Cruz-Guilloty et al., 2013). De manière intéressante, l'utilisation de souris *Ccr2<sup>-/-</sup>* avec leur modèle d'immunisation inhibe totalement l'infiltration et le recrutement des PM dans l'espace sous-rétinien et inhibe la dégénérescence des PR.

Hollyfield et al. ont également montré que le CEP est retrouvé dans le sang et les yeux des patients atteints de DMLA. Les souris immunisées par du CEP présentent une accumulation de drusen sous l'EPR, une infiltration de cellules inflammatoires au niveau des lésions, une diminution de l'amplitude de l'onde a et b en réponse à la lumière et développent une dégénérescence de l'EPR qui sont caractéristiques d'une DMLA atrophique (Hollyfield et al., 2010).

#### 4-2-6-3 Modèle de souris *Ccr2<sup>-/-</sup>, Ccl2<sup>-/-</sup>, Ccl2<sup>-/-</sup> Cx3cr1<sup>-/-</sup> (Crb1<sup>rd8/rd8</sup>)*

Ambati et ses collaborateurs ont observé que l'absence de l'axe CCL2/CCR2 (qui est impliqué dans le recrutement des PM) entraînait plusieurs symptômes de la DMLA comme des dépôts blanchâtres sous-rétiniens (des drusen-like), la présence de lipofuscine dans l'EPR et une dégénérescence des PR chez les souris âgées de 18 mois. Ces résultats suggèrent qu'un défaut de recrutement des PM de la circulation pourrait conduire à l'accumulation délétère de débris cellulaire et à une inflammation (Ambati et al., 2003b).

A la suite des travaux d'Ambati, Chen et ses collaborateurs ont générés des souris *Ccl2<sup>-/-</sup> Cx3cr1<sup>-/-</sup>* comme modèle de DMLA dans l'espoir que l'association de ces deux facteurs agraverait le phénotype oculaire et accélérerait son déclenchement (Tuo et al., 2007). Ils ont effectivement observé de graves lésions oculaires (présence de drusen, une atrophie de l'EPR et des PR et une néovascularisation spontanée) chez les souris *Cx3cr1<sup>-/-</sup> Ccl2<sup>-/-</sup>* à partir de six semaines.

Cependant, la pertinence de ce modèle semble remise en cause par d'autres laboratoires qui n'ont pas pu reproduire ces résultats (Luhmann et al., 2009); (Chen et al., 2011). En effet, Luhmann et al. n'ont observé aucune dégénérescence des PR chez les souris *Ccl2<sup>-/-</sup>* à 24 mois.

La raison de ces différentes observations pourrait être expliquée par le fait que les souris utilisées par les équipes d'Ambati et de Tuo possédaient la mutation *rd8* dans le gène *Crb1* (Luhmann et al., 2012); (Mattapallil et al., 2012). En effet, toutes les lignées générées à partir

de la souche C57BL/6N (comme les souris *Ccl2*<sup>-/-</sup> et les *Ccl2*<sup>-/-</sup> *Cx3cr1*<sup>-/-</sup>) portent la mutation *rd8* qui entraîne des lésions rétiniennes dès l'âge de 6 semaines. On peut également observer une atrophie des PR qui est associée à la présence massive de PM sous-rétiniens et ainsi que l'apparition de néovaisseaux choroïdiens. Il devient donc difficile d'interpréter si les phénotypes observés par l'équipe d'Ambati et de Tuo sont dus à la déficience de *Ccl2* ou à la mutation *rd8*. Depuis cette découverte les travaux de cette équipe font référence à ce modèle en tant que souris « *Cx3cr1*<sup>-/-</sup>/*Ccl2*<sup>-/-</sup> sur fond *rd8* »

De plus, notre laboratoire a récemment démontré que l'absence de recrutement des Mo de la circulation (absence de l'axe CCL2/CCR2) protégerait les souris *Cx3cr1*<sup>-/-</sup> contre l'infiltration sous-rétinienne et de la dégénérescence des PR (Sennlaub et al., 2013).

#### 4-2-6-4 Modèle de souris *Cx3cr1*<sup>-/-</sup>

Même si le polymorphisme de *Cx3cr1* T280M n'est pas systématiquement associé à une prévalence plus importante de développer une DMLA (Zerbib et al., 2011), ce modèle reste un bon modèle d'inflammation sous-rétinienne qui permet de donner des éléments de réponse sur la pathologie humaine.

Dans la rétine, le récepteur CX3CR1 est principalement exprimé par les CM (Combadiere et al., 2007) et le contact avec son ligand CX3CL1 constitutivement exprimé par les neurones maintient les CM dans un état quiescent (non activé). Combadière et ses collaborateurs ont tout d'abord montré la présence de cellules CX3CR1+ (comarquées avec CD18 un marqueur de CM) dans l'espace sous-rétinien proche des zones atrophiques chez les patients atteints de DMLA atrophique ce qui suggère que CX3CR1 pourrait jouer un rôle dans la pathologie de la DMLA (Combadiere et al., 2007).

Au cours du vieillissement, les souris *Cx3cr1*<sup>-/-</sup> présentent une accumulation de PM dans l'espace sous-rétinien avec l'âge (à 18 mois) suggérant que cette accumulation serait dépendante de l'âge comme dans la pathologie humaine. L'accumulation précoce de PM dans l'espace sous-rétinien est associée à une dégénérescence des PR (diminution de l'épaisseur de la CNE). De plus, ces auteurs ont observé la présence de pseudo-drusen (comme des cellules spumeuses) dans l'espace sous-rétinien correspondant à des PM qui ont phagocyté intensément les SE des PR (présence de lipides et de rhodopsine (Gupta et al., 2003). Mais leur localisation ne correspond pas aux drusen retrouvés chez l'humain entre l'EPR et la MB. Enfin, les souris *Cx3cr1*<sup>-/-</sup> présentent également une néovascularisation choroïdienne exacerbée dans un modèle de photocoagulation au laser avec un recrutement accru de PM autour des impacts qui secrètent des facteurs angiogéniques comme le VEGF (Ma et al., 2009).

Toutes ces données montrent que la souris *Cx3cr1*<sup>-/-</sup> est un très bon modèle pour étudier l'implication de l'inflammation sous-rétinienne dans la physiopathologie de la DMLA qui

pourrait être le facteur déclenchant dans cette maladie. Même si elles ne possèdent pas toutes les caractéristiques de la pathologie humaine (l'atrophie de l'EPR et la formation de drusen), ces souris présentent une inflammation sous-rétinienne avec l'âge qui est associée à une dégénérescence secondaire des PR.

# V- P2RX7, Inflamasome NLRP3 et IL-1 $\beta$

L'inflamasome est un complexe multiprotéique qui joue un rôle clé dans l'immunité innée en participant à la production de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 (Brydges et al., 2013). Ces cytokines pro-inflammatoires sont impliquées dans une grande variété d'effets biologiques tels que l'infection, l'inflammation et des processus auto-immuns (Shaftel et al., 2008). Le gène *IL-1 $\beta$*  est transcrit après activation des TLR, puis un second stimulus est nécessaire, comme l'activation du P2RX7 par l'ATP extracellulaire pour induire l'assemblage du complexe NLRP3 et obtenir la forme mature de l'IL-1 $\beta$  (Mariathasan et al., 2006). Cette partie va principalement se focaliser sur ces trois acteurs.

## 5-1 Le récepteur P2X7

### 5-1-1 Généralités

Les récepteurs P2 font partie d'une famille diversifiée de protéines membranaires. Elle est composée de récepteurs P2Y- (récepteurs métabotropes) qui sont couplés à des protéines G et de récepteurs P2X- (récepteurs purinergiques ionotropes) qui sont des canaux cationiques (Figure. 31) (Abbracchio and Burnstock, 1994).

Les récepteurs purinergiques P2Y sont divisés en huit membres (P2RY1, P2RY2, P2RY4, P2RY6, P2RY11, P2RY12, P2RY13 et P2RY14) (Boeynaems et al., 2005). Ce sont des protéines à sept domaines transmembranaires ayant une structure typique des récepteurs couplés aux protéines G. Ces récepteurs sont caractérisés dans une variété de cellules (Abbracchio et al., 2006); (Jacobson and Boeynaems, 2010) et possèdent de nombreux ligands comme l'ATP, l'UTP, l'ADP ou encore l'UDP (Junger, 2011).

Les récepteurs purinergiques P2X (P2RX) sont des récepteurs ionotropes qui sont divisés en sept membres (P2RX1 à P2RX7), possèdent une affinité forte pour l'ATP et beaucoup plus faible pour l'ADP et l'AMP (Burnstock et al., 2012); (North, 2002).

Chaque P2RX- est constitué de deux domaines hydrophobes transmembranaires séparés par une boucle extracellulaire contenant le site de liaison à l'ATP (Rassendren et al., 1997) et une région intracellulaire N- et C- terminale (Figure. 31). Les P2RX existent sous forme d'homo-trimères ou d'hétéro-trimères et trois molécules d'ATP sont nécessaires pour activer les P2RX- (Jarvis and Khakh, 2009). L'activation des ces récepteurs modifie le potentiel de membrane, conduisant à des évènements cellulaires pouvant jouer un rôle dans la

modulation de neurotransmetteurs (Sperlagh et al., 2007); (Khakh, 2001), l'activation des PM (Wewers and Sarkar, 2009) et l'apoptose (Kawano et al., 2012).

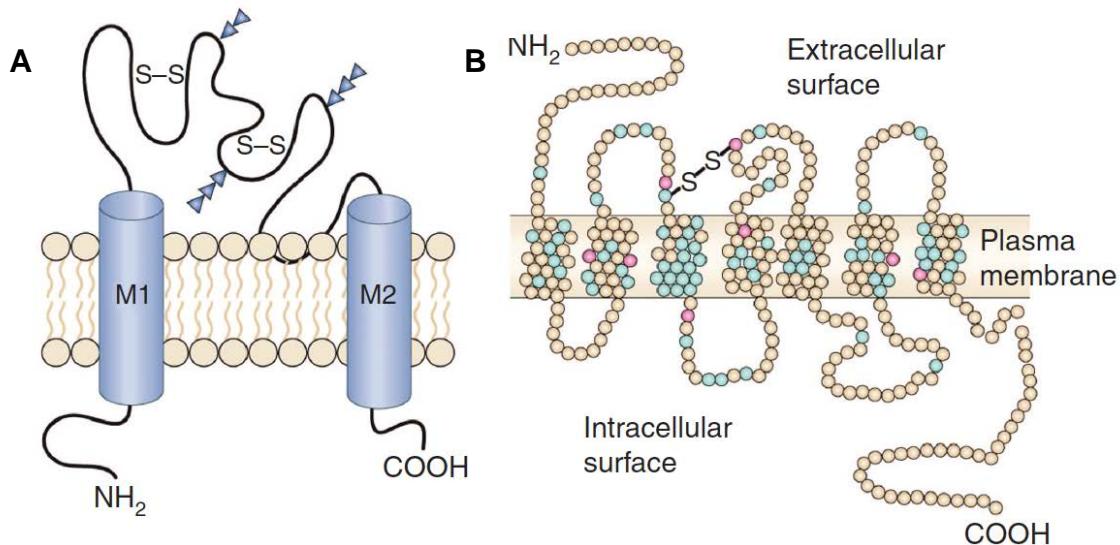


Figure 31: Les récepteurs P2.

- A) La famille des récepteurs P2X- qui sont des canaux cationique avec 2 domaines transmembranaires (M1 et M2) et une boucle extracellulaire.  
 B) La famille des récepteurs P2Y- qui sont des G protein coupled receptor.  
 (Burnstock, J Invest Dermatol, 2012)

### 5-1-2 Le récepteur P2X7 (P2RX7)

Le P2RX7 a acquis ces dernières années une reconnaissance très importante en tant que régulateur de l'inflammation (Lister et al., 2007).

Le gène humain est localisé sur le chromosome 12q34. C'est un gène hautement polymorphe avec plus de 686 single nucleotide polymorphism (SNP) (Ferrari et al., 2006); (Sun et al., 2010). La plupart des SNP entraînent une perte de fonction (Gu et al., 2001); (Shemon et al., 2006); (Saunders et al., 2003). Le gène code pour une protéine de 595 acides aminés avec une chaîne C-terminale très longue qui le distingue des autres P2RX. Cette longue chaîne va interagir avec des protéines intracellulaires (Kim et al., 2001) ce qui va permettre la formation des pores et la stabilisation du récepteur à la membrane (Boldt et al., 2003); (Feng et al., 2006). Le P2RX7 est principalement exprimé par les cellules du système immunitaire comme les Mo/Mp, les cellules dendritiques et les lymphocytes (Burnstock and Knight, 2004). Dans l'œil, le P2RX7 est exprimé par les CM, les cellules amacriennes et les cellules ganglionnaires (Brandle et al., 1998b).

Ce récepteur possède une affinité plus faible pour l'ATP que les autres P2RX et nécessite une concentration d'ATP d'1 mM pour être activé (Arulkumaran et al., 2011).

### 5-1-3 Fonctions

La stimulation du P2RX7 peut entraîner l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires telles que les protéines kinases PKC et PKD (Bradford and Soltoff, 2002), les ERK1/2 (Amstrup and Novak, 2003) ou encore les facteurs de transcription comme l'activator protein 1 (AP-1) et NF-κB (Lenertz et al., 2009); (Liu et al., 2011).

Le P2RX7 est impliqué dans la production de ROS (Parvathenani et al., 2003); (Cruz et al., 2007). En effet, Lenertz et ses collaborateurs ont montré que le P2RX7 induisait la production de ROS dans les cultures de Mo humains *via* l'activation d'ERK1/2 et de la NADPH oxydase (Lenertz et al., 2009).

L'activation du P2RX7 par l'ATP induit également un influx de sodium, de calcium et un efflux de potassium (Virginio et al., 1997); (Sperlagh et al., 2006); (Jiang, 2009).

Si l'activation perdure dans le temps, il y a formation de pores cytolytiques par la pannexine-1 (Bond and Naus, 2014); (Makarenkova and Shestopalov, 2014); (Pelegrin and Surprenant, 2006). Ces pores permettent l'entrée cytoplasmique de facteurs extracellulaires pouvant par exemple activer l'inflammasome (Pelegrin and Surprenant, 2006); (Ferrari et al., 2006). Les pannexines présentent des homologies avec les innexines des invertébrés et peuvent former des canaux permettant la sécrétion de petites molécules jusqu'à 900 Da comme l'ATP (Wang et al., 2007); (Iglesias et al., 2008) et le yo-pro qui est un marqueur fluorescent (Smart et al., 2003); (Bartlett et al., 2013). Il existe trois types de pannexines: les pannexines -1, -2 et -3. Il a été suggéré que la pannexine-1 était indispensable à la formation des pores avec le P2RX7 (Locovei, 2007 #8947); (Pelegrin and Surprenant, 2006). Cependant d'autres travaux ont montré la présence de pores même lorsque la protéine pannexine-1 était déficiente (Bond and Naus, 2014). Ces auteurs ont suggéré que le P2RX7 pouvait lui-même se dilater pour former le pore ou que le P2RX7 interagissait avec d'autres canaux non encore identifiés (Hanley et al., 2012); (Rigato et al., 2012); (Xu et al., 2012); (Alberto et al., 2013).

La formation de ces pores peut induire la mort des cellules qui ont perdu leur intégrité membranaire (Notomi et al., 2013); (Diaz-Hernandez et al., 2009). C'est le cas par exemple lors d'un processus pathologique comme une augmentation locale d'ATP (relargué par les neurones en souffrance) ou une inhibition des ecto-nucléotidases, où le P2RX7 peut être suractivé (Lenertz et al., 2011); (Lazarowski et al., 2003).

Cependant une équipe a montré que la surexpression du P2RX7 en conditions physiologiques pouvait conduire à la prolifération des CM *via* la formation de pores au niveau

de la membrane (Monif et al., 2009). Le P2RX7 est également impliqué dans la prolifération de certaines lignées cellulaires comme les K562, LG14 et les lymphocytes T et B (Yip et al., 2009); (Adinolfi et al., 2009); (Baricordi et al., 1999); (Greig et al., 2003). Cela suggère qu'en fonction du type cellulaire, la formation des pores peut avoir des rôles différents.

Et enfin l'activation du P2RX7 par l'ATP peut activer l'inflammasome et ainsi la libération de la cytokine IL-1 $\beta$  (Ferrari et al., 2006); (Sanz and Di Virgilio, 2000) (voir ci-dessous 5-2-2).

### 5-1-4 Implication du P2RX7 dans les pathologies neuro-dégénératives

Le P2RX7 est associé à de nombreuses pathologies neuro-inflammatoires telles que la sclérose en plaques (Yiangou et al., 2006), la maladie d'Alzheimer (Ryu and McLarnon, 2008) ou encore l'ischémie cérébrale (Chu et al., 2012). Ce récepteur est fortement exprimé par les PM (Mo, Mp et CM dans le cerveau) jouant un rôle important dans l'immunité innée. L'activation du récepteur induit une sécrétion d'IL-1 $\beta$  (Ferrari et al., 1997) qui joue un rôle clé dans les pathologies neuro-dégénératives (Allan and Rothwell, 2001). Cette partie sera détaillée dans la partie suivante (chapitre 5-3).

Des études faites chez le rat dans un modèle d'ischémie montrent que l'administration d'un antagoniste du P2RX7 améliore fortement l'ischémie en réduisant la réponse inflammatoire (Chu et al., 2012). Peng et ses collaborateurs ont montré que l'inhibition de P2RX7 protégeait les neurones d'une excitotoxicité en diminuant l'inflammation locale dans un modèle de lésion de la moelle épinière chez le rat (Peng et al., 2009).

Ces dernières années, le P2RX7 est devenu une cible thérapeutique potentielle. Ainsi des antagonistes sélectifs ont été développés comme le brilliant blue G (BBG), l'A-438079 et l'A-740003 (Nelson et al., 2006); (Honore et al., 2006).

Les anti-P2RX7 ont notamment été testé dans un certains nombres de modèles de pathologies oculaires. Le BBG (Notomi et al., 2013) réduit efficacement la mort des photorécepteurs dans un modèle d'hémorragies sous-rétiniennes chez la souris qui reproduit les hémorragies associées aux DMLA Humides. De même, l'inhibition du P2RX7 par le BBG réduit fortement la mort des cellules ganglionnaires dans un modèle de glaucome chez l'homme (Niyadurupola et al., 2013). Enfin, Kerur et al. ont montré dans la GA, que l'accumulation de l'ARN Alu due à une déficience de DICER1 induit une sécrétion d'IL-18 via l'inflammasome NLRP3. Cette cytokine induirait une dégénérescence très importante des cellules de l'EPR et l'utilisation d'un inhibiteur du P2RX7, le A-740003 réduit fortement la perte des cellules de l'EPR (Kerur et al., 2013).

Cependant, il est toujours difficile de déterminer si la neurotoxicité observée dans ces différents modèles est due à l'effet toxique direct de l'ATP sur les neurones (Puthusseray and Fletcher, 2009) ou plutôt un effet indirect de l'ATP *via* l'activation de l'inflamasome dans les PM. En effet, il a été proposé que l'ATP puisse induire la mort des neurones dans un modèle d'hémorragies sous-rétiniennes (Notomi et al., 2013), même si dans cette étude la présence de PM n'est pas exclue. Deux études ont effectivement montré que l'ATP pouvait induire une mort neuronale mais seulement en présence de PM dans les cocultures. De plus l'utilisation de PM *P2rx7*<sup>-/-</sup> inhibait totalement l'effet de l'ATP sur la mort neuronale (Skaper et al., 2006); (Anccasi et al., 2013). Ces données montrent que l'ATP jouerait plutôt un rôle dans l'activation des PM.

## 5-2 Inflammasome NLRP3

Les inflammasomes sont des complexes multi-protéiques de haut poids moléculaire de l'ordre de  $10^3$  kDa (tripartites) composés d'un récepteur NLR, d'une protéine adaptatrice ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD) et d'une protéine effectrice de la famille des caspases (Tschopp and Schroder, 2010); (Martinon et al., 2002) (Figure. 32).

Comme ces complexes sont impliqués dans l'immunité innée reconnaissant des pathogènes et des signaux de danger, ils sont inactifs (non assemblés) à l'état basal.

L'assemblage s'effectue en présence d'un activateur et permet le recrutement de la protéine ASC puis de la protéine effectrice, la caspase-1 responsable du clivage de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 (Brydges et al., 2013). Le recrutement entre les différents partenaires se fait *via* des interactions domaine-domaine (Bauernfeind et al., 2011).

### 5-2-1 Structure NLRP3

La protéine NLR la plus étudiée est NLRP3, qui est constituée d'un domaine PYD en position N-terminale, d'un domaine NACHT et d'un domaine LRR en position C-terminale (Figure. 32). NLRP3 est une protéine de 110 kDa. Son gène se trouve sur le chromosome 1q44 (Hoffman et al., 2001). Aujourd'hui NLRP3 est au centre de la majorité des recherches portant sur les inflammasomes car les mutations qui l'affectent sont associées à de nombreuses pathologies inflammatoires (Agostini et al., 2004); (Walsh et al., 2014). L'inflammasome NLRP3 est donc le mieux caractérisé en terme de signaux activateurs mais également en terme d'implications physiopathologiques.

NLRP3 est fortement exprimé par les cellules dendritiques, les Mo (Guarda et al., 2011) et les CM (Halle et al., 2008) mais faiblement par les neutrophiles et les Mp (Guarda et al., 2011).

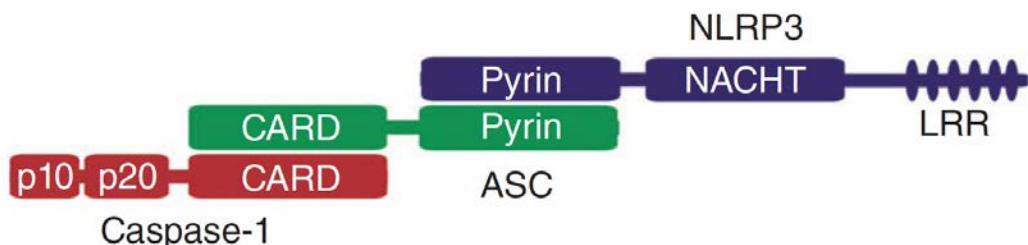


Figure 32: Structure de l'inflammasome NLRP3.

L'activation de NLRP3 induit le recrutement de la protéine ASC puis de la protéine effectrice, la caspase-1 responsable du clivage de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18. (Menu, Clin Exp Immunol, 2011)

## 5-2-2 L'activation

L'activation requiert un premier signal de « priming » (Guarda et al., 2011). Ce signal est dépendant de la voie NF- $\kappa$ B et peut-être activé par des récepteurs de cytokines pro-inflammatoires ou des récepteurs de type TLR qui appartiennent à la famille des récepteurs de reconnaissance de motifs de molécules associés aux pathogènes. Ces derniers peuvent reconnaître des signatures microbiennes telles que les liposaccharides de la paroi des bactéries, l'ARN double brin des virus, les îlots CpG non méthylés de l'ADN bactérien et viral ou encore les protéines comme la flagelline (Akira et al., 2006). Ce signal de priming conduit à la surexpression de NLRP3 (Bauernfeind et al., 2009). Le récepteur NLRP3, après transcription, doit également être déubiquitiné pour pouvoir être activé par ses agonistes (Juliana et al., 2012).

Un deuxième signal est nécessaire pour permettre l'oligomérisation de l'inflammasome NLRP3. L'assemblage de l'inflammasome peut être activé par une grande variété d'agonistes comme les composants issus d'infection comme les PAMP, le LPS, les ARN bactériens et viraux, issus de dommages tissulaires comme l'ATP via son récepteur P2RX7 (Figure. 33) (Mariathasan et al., 2006), la silice ou encore l'amiante (Dostert et al., 2008); (Di Virgilio, 2013).

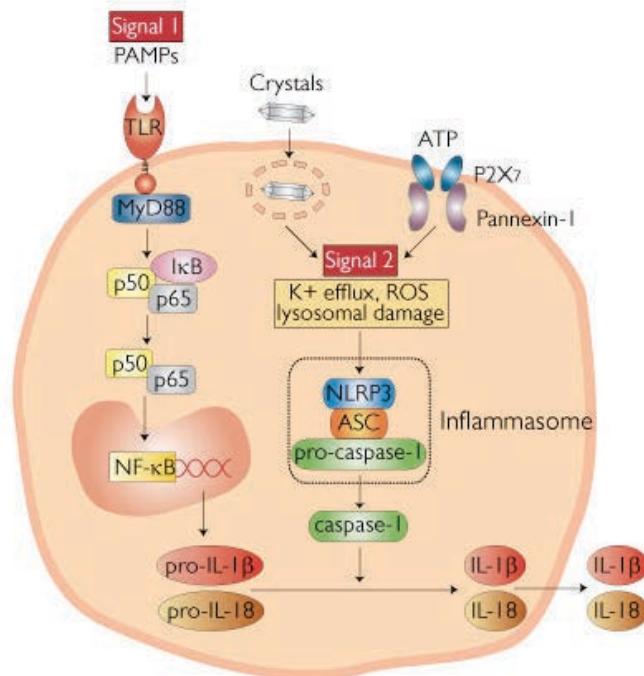


Figure 33: L'activation de l'inflammasome NLRP3.

Les PAMP, l'ATP extracellulaire, les cristaux d'acide urique, ou encore les cristaux de cholestérol peuvent activer l'inflammasome NLRP3.

(Invivogen, 2009)

Etant donné l'hétérogénéité des molécules pouvant activer l'inflammasome NLRP3, de nombreux mécanismes sont proposés pour son activation. Trois processus d'activation de l'inflammasome NLRP3 sont principalement proposés (Figure. 34). Le plus important est l'efflux de potassium qui est induit par presque tous les activateurs de l'inflammasome NLRP3 (Ferrari et al., 2006); (Allam et al., 2011); (Lamkanfi et al., 2009). Le second est consécutif à la rupture de la membrane des phagolysosomes causée par l'internalisation de microparticules comme la silice, l'amiante ou l'aluminium (Hornung et al., 2008). Et le dernier est la production et la libération de ROS et d'ADN mitochondrial suite à un dysfonctionnement mitochondrial (Zhou et al., 2011); (Nakahira et al., 2011); (Shimada et al., 2012).

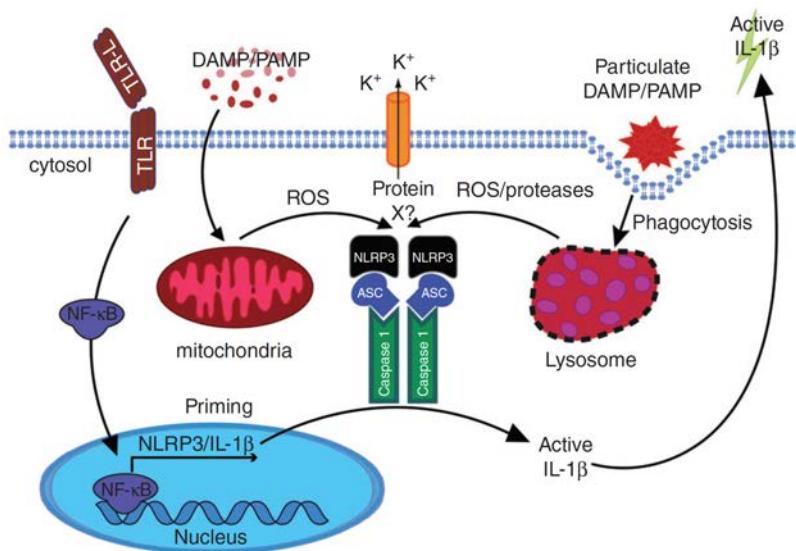


Figure 34: Trois processus d'activation de l'inflammasome NLRP3.

Trois processus d'activation de l'inflammasome NLRP3 sont principalement proposés. Le plus important est l'efflux de potassium qui est une conséquence induite par presque tous les activateurs de l'inflammasome. Le second est consécutif à la rupture de la membrane des phagolysosomes causée par l'internalisation de microparticules comme la silice, l'amiante ou l'aluminium. Et le dernier est la production et la libération de ROS et d'ADN mitochondrial suite à un dysfonctionnement mitochondrial.

(Menu, Clin Exp Immunol, 2011)

Après activation, NLRP3 s'oligomérise *via* des interactions homotypiques entre les domaines NACHT et présente son domaine pyrin au domaine pyrin de la protéine accessoire ASC (Dinarello, 2007). ASC interagit alors *via* son domaine CARD avec le domaine CARD de la pro-caspase-1. Lors de cet assemblage, la caspase-1 est activée par formation d'un hétérotétramère constitué de deux protéines p20 contenant le site actif et de deux protéines p10 (Kahlenberg and Dubyak, 2004); (Broz et al., 2010). La caspase-1, une fois activée peut induire la mort cellulaire ou cliver les cytokines pro-inflammatoires proIL-1 $\beta$  et proIL-18 (dos Santos et al., 2012) (Figure. 35).

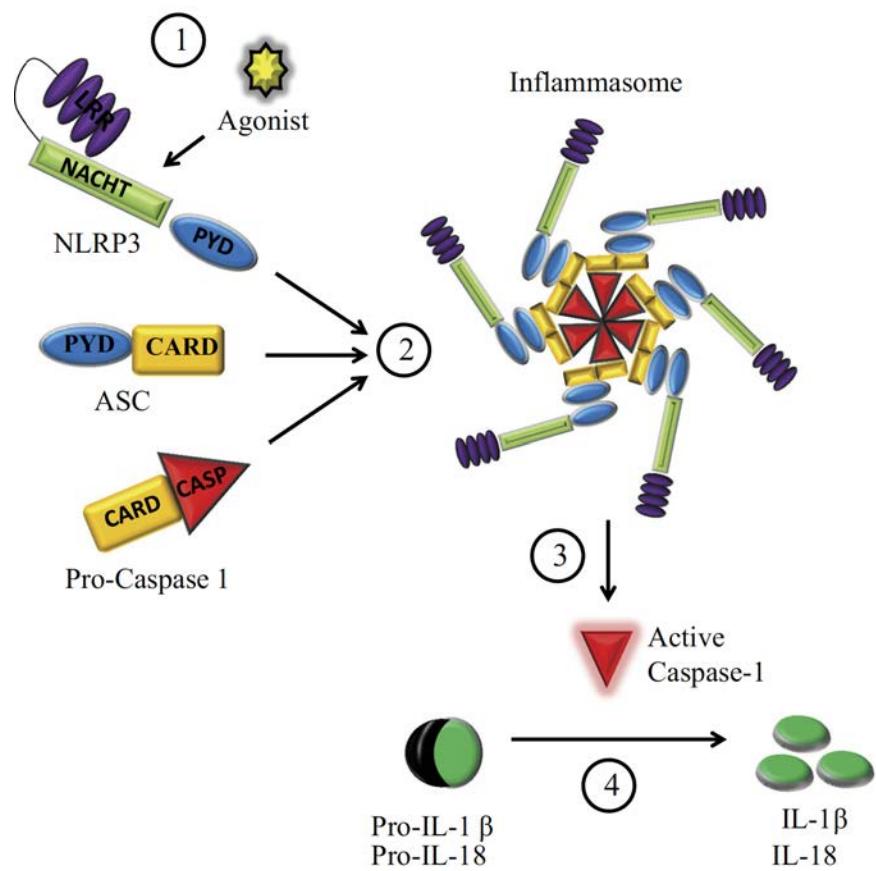


Figure 35: Assemblage de l'inflammasome NLRP3.

Lors d'une stimulation (1) NLRP3 recrute la pro-caspase-1 *via* la protéine adaptatrice ASC contenant le domaine CARD pour former l'inflammasome (2). L'activation de l'inflammasome va cliver la pro-caspase-1 en caspase-1 mature (3) qui va à son tour cliver la proIL-1 $\beta$  et la proIL-18 en IL-1 $\beta$  et IL-18 matures (4). (Santos, Am J Physiol, 2012)

### 5-2-3 Régulation de l'inflammasome NLRP3

Une fois activé, plusieurs mécanismes concourent à l'inhibition de l'inflammasome afin d'éviter une inflammation chronique. NLRP3 possède un système d'auto-inhibition *via* le domaine LRR faisant intervenir les protéines chaperonnes SGT1 et HSP90 (Schroder and Tschopp, 2010); (Zhou et al., 2010). Par ailleurs, il existe plusieurs isoformes de la protéine adaptatrice ASC (b, c et d). Il semblerait que la forme ASC-c inhibe le fonctionnement de l'inflammasome (Bryan et al., 2010); (Di Virgilio, 2013). Enfin, il a été montré que l'IFN $\alpha$ , l'IFN $\beta$ , l'IL-10 ou encore le NO inhiberaient le clivage de la proIL-1 $\beta$  par l'inflammasome NLRP3 (Lee et al., 2012); (Sutterwala et al., 2014).

### 5-2-4 Inflammasome NLRP3 et pathologies rétiennes

L'activation de l'inflammasome NLRP3 contribue à la pathogénèse de nombreuses maladies inflammatoires comme la fibrose pulmonaire (Artlett, 2012), la polyarthrite rhumatoïde (Vande Walle et al., 2014), la goutte (Kingsbury et al., 2011) ou la maladie de Crohn (Villani et al., 2009). Au niveau de l'œil, l'hyperglycémie active l'inflammasome dans les cellules rétiennes ce qui induit une activation de la caspase-1 et de l'expression de la cytokine pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  (Devi et al., 2012).

L'activation de l'inflammasome est également impliquée dans la dégénérescence de l'EPR dans la pathologie de la DMLA (Tseng et al., 2013); (Kerur et al., 2013). Il a été montré que les protéines de drusen étaient capables d'activer l'inflammasome NLRP3 (Doyle et al., 2012). Cependant, le rôle protecteur ou délétère de l'inflammasome dans la pathologie de la DMLA reste à déterminer. En effet, Doyle et al. ont montré dans un modèle de DMLA humide que les drusen activeraient l'inflammasome dans les Mo ce qui conduirait à une synthèse et une sécrétion d'IL-18. Cette cytokine inhiberait l'expression du VEGF (qui est impliquée dans l'angiogenèse) et une diminution de la dégénérescence neuronale (Doyle et al., 2012). Cependant, une autre équipe (Tarallo et al., 2012) a montré dans un modèle de DMLA atrophique que l'activation de l'inflammasome NLRP3 par les cellules de l'EPR induirait la synthèse d'IL-18 ce qui conduirait à une dégénérescence très importante de ces cellules.

## 5-3 Interleukine-1

La famille d'IL-1 est composée de 11 membres nommés d'IL-1F1 à IL-1F11 (Sims et al., 2001). Les isoformes IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  et l'antagoniste du récepteur à l'IL-1, l'IL-1Ra sont les plus étudiées. Ces trois gènes comportent de fortes homologies et sont portés par le bras

long du chromosome 2 chez l'homme et la souris (March et al., 1985); (Eisenberg et al., 1990).

A l'exception d'IL-1Ra, tous les autres membres de cette famille sont synthétisés sous la forme de précurseurs (Garlanda et al., 2013). La proIL-1 $\alpha$  est biologiquement active alors que la proIL-1 $\beta$  nécessite d'être clivée pour exercer son effet biologique (Dinarello, 2010); (Eder, 2009).

Les cytokines de cette famille jouent un rôle de premier ordre dans la régulation de la réaction inflammatoire, exerçantes des effets pro- ou anti-inflammatoire. Une régulation fine de ces cytokines est primordiale pour garder l'homéostasie de l'organisme.

### 5-3-1 IL-1 $\alpha$

Le précurseur d'IL-1 $\alpha$  est constitutivement exprimé dans la peau, dans le foie, dans les reins ou encore dans les poumons. Bien qu'elle soit dotée d'un domaine précurseur qui peut être clivé par la calpaïne (qui est une enzyme peu spécifique), elle est biologiquement active (Kobayashi et al., 1990). L'IL-1 $\alpha$  ne possède pas de peptide signal lui permettant d'emprunter la voie classique de sécrétion des protéines (*via* le réticulum endoplasmique et l'appareil de golgi) (Dinarello, 2010).

Au niveau cellulaire, l'IL-1 $\alpha$  peut être retrouvée dans le noyau, le cytoplasme, liée à la membrane ou sécrétée dans le milieu extracellulaire (Rider et al., 2013).

L'IL-1 $\alpha$  peut agir comme un facteur de transcription (possédant un domaine de liaison à l'ADN) (Rider et al., 2013).

Lors d'une apoptose, l'IL-1 $\alpha$  cytosolique est séquestrée dans le noyau et se lie à la chromatine, ce qui empêche le déclenchement d'une réponse inflammatoire. Inversement, lors d'une nécrose, l'IL-1 $\alpha$  va être libérée dans le milieu extracellulaire comme signal de danger (Rider et al., 2013). Elle agit alors comme une « alarme » pour alerter le système immunitaire. IL-1 $\alpha$  est probablement un bon signal d'alarme puisqu'elle est constitutivement exprimée par les tissus en condition normale, et peut être libérée à tout moment pour induire la production de cytokines et Ck comme dans le cadre d'une inflammation stérile (Chen et al., 2007); (Rider et al., 2011).

### 5-3-2 IL-1Ra

IL-1Ra est produite par les mêmes types cellulaires qui expriment l'IL-1 mais sans induire de réponse intracellulaire. En effet, IL-1Ra est un inhibiteur compétitif naturel d'IL-1 $\alpha$  et  $\beta$  qui se

fixe sur les mêmes sous-unités d'IL-1R1 (IL-1 Receptor 1) empêchant le recrutement de la sous-unité IL-1RAcP (IL-1 Receptor accessory protein) qui est indispensable pour induire la cascade de signalisation. Cette glycoprotéine de 17 kDa n'est pas synthétisée sous forme de précurseur et elle est la seule cytokine de la famille d'IL-1 à posséder un signal peptide (Garlanda et al., 2013).

Il existe la forme principale IL-1Ra soluble (sIL-1Ra) et trois isoformes intracellulaires (icIL-1Ra1, icIL-1Ra2, icIL-1Ra3) qui jouent plutôt un rôle de « réservoir » d'IL-1Ra, libérée pendant le mort cellulaire, limitant ainsi la réaction inflammatoire (Allan et al., 2005).

### 5-3-3 IL-1 $\beta$

IL-1 $\beta$  est principalement synthétisée par les cellules hématopoïétiques comme les Mo circulants, les Mp ou encore les CM (Dinarello, 2009); (Eriksson et al., 1999). La libération de l'IL-1 $\beta$  par les cellules se fait en deux temps: elle est tout d'abord synthétisée sous forme de protéine précurseur de 31 kDa, biologiquement inactive puis sa conversion en IL-1 $\beta$  mature de 17 kDa *via* l'inflammasome (Wilson et al., 1994); (Black et al., 1989). Ces deux étapes sont étroitement liées.

### 5-4-3-1 Synthèse

La synthèse de la proIL-1 $\beta$  est induite suite à une activation des récepteurs aux cytokines (Marucha et al., 1990); (Li et al., 2009); (Dinarello, 2007) ou des récepteurs TLR. L'engagement de ces récepteurs induit l'activation des facteurs de transcription de gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires comme NF- $\kappa$ B (Weber et al., 2010).

L'activation de NF- $\kappa$ B conduit à la synthèse de la proIL-1 $\beta$  qui s'accumule dans le cytoplasme. Cependant, cette induction de la synthèse de la proIL-1 $\beta$  ne signifie pas obligatoirement une augmentation de la production de l'IL-1 $\beta$  (Figure. 33) (Dinarello, 2007).

En effet, la maturation de la ProIL-1 $\beta$  en forme active et sa sécrétion repose sur la génération d'un second signal. Ce clivage se fait *via* l'activation de l'inflammasome (Figure. 33). L'activation de l'inflammasome va déclencher l'activation du zymogène inactif la pro-caspase-1 en caspase-1, qui va aller cliver à son tour la proIL-1 $\beta$  et être sécrétée dans le milieu extracellulaire (Ferrari et al., 2006); (Sanz and Di Virgilio, 2000).

Le clivage, ainsi que la maturation d'IL-1 $\beta$  pourraient également se faire à l'extérieur de la cellule en faisant intervenir d'autres protéases que la caspase-1 (mais de façon minoritaire) comme les protéases à sérine des neutrophiles (la protéinases-3, l'élastase, la cathepsine

G), les métalloprotéases matricielles (MMP-9) ou encore les protéases de cellules T cytotoxiques (granzymes) (Wittmann et al., 2011).

Dans les Mo humains, la caspase-1 associée à l'inflammasome NLRP3 est constitutivement active permettant la libération d'IL-1 $\beta$  après stimulation par du LPS (Figure. 36) (Netea et al., 2009). Tandis que les Mp ont besoin des 2 signaux (un premier *via* l'activation des TLR qui permet la transcription de la proIL-1 $\beta$  et un deuxième signal *via* l'activation de l'inflammasome pour le clivage) (Kanneganti et al., 2007).

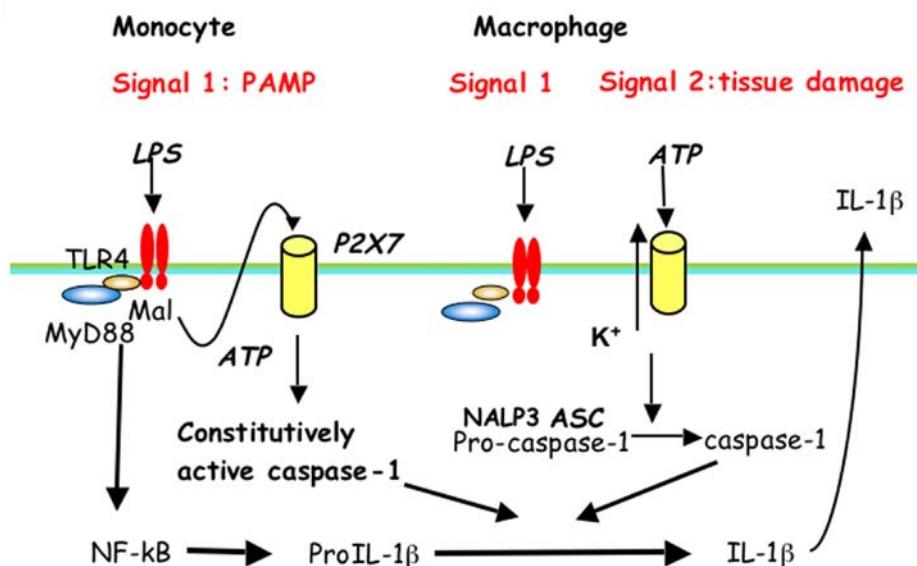


Figure 36: Différence entre Mo et Mp.

Schéma représentant la voie d'IL-1 $\beta$  dans les Mo et les Mp. La caspase-1 est constitutivement activée dans les Mo et ces cellules sont capables de sécréter l'IL-1 $\beta$  mature après simple stimulation des TLR. Contrairement aux Mp, qui ont besoin de la présence des 2 signaux: stimulation des TLR et de l'ATP pour induire la sécrétion d'IL-1 $\beta$ .

(Netea, Blood, 2009)

### 5-4-3-2 Sécrétion

Plusieurs mécanismes de sécrétion d'IL-1 $\beta$  ont été évoqués en fonction des situations et des types cellulaires considérés (Mariathasan and Monack, 2007).

Il a été montré qu'IL-1 $\beta$  pouvait être sécrétée par une voie qui serait dépendante des lysosomes sécrétoires. Piccioli et al, ont observé la présence de la proIL-1 $\beta$  et de la caspase-1 dans les lysosomes sécrétoires dans les Mo circulants humain après induction avec du LPS (Piccioli and Rubartelli, 2013). La présence d'ATP exogène induit l'exocytose des lysosomes sécrétoires et donc une libération d'IL-1 $\beta$ . Elle peut également se faire *via* la

libération d'exososomes dérivés de corps vésiculaires (Qu et al., 2007), par la libération de microvésicules de la membrane plasmique (MacKenzie et al., 2001), par l'autophagie «secretory autophagy» *via* la fusion d'un autophagosome et d'un endosome (Piccioli and Rubartelli, 2013) et par la translocation membranaire des cellules en pyroptose (la membrane plasmique devient perméable) (Piccioli and Rubartelli, 2013). Il est maintenant bien établi que la libération d'IL-1 $\beta$  se fait de façon non conventionnelle, mais le mécanisme physiologique exact reste encore mal connu et dépend surtout du type cellulaire. Il semble qu'elle puisse être sécrétée par plusieurs façons différentes en parallèle (Eder, 2009).

### 5-4-3-3 Implication de l'IL-1 $\beta$ dans la neuro-dégénérescence

Il est maintenant clairement démontré qu'IL-1 $\beta$  joue un rôle dans la mise en place de la neuro-inflammation que ce soit aigüe ou chronique (Figure. 37). L'injection d'IL-1 $\beta$  dans le cerveau des murins induit rapidement une activation des astrocytes et des CM provoquant l'expression des cytokines inflammatoires comme IL-6 et Cox-2 (Basu et al., 2002); (Lin et al., 2006). Dans un modèle de Parkinson, l'injection de LPS dans la substance noire induit une exacerbation de la neuro-dégénérescence. Ces auteurs ont observé une activation des CM qui était responsable de la mort des neurones dopaminergiques *via* une sécrétion d'IL-1 $\beta$  (Pott Godoy et al., 2008). IL-1 est également impliquée dans l'initiation et la propagation de la neuro-inflammation chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer en favorisant la mort neuronale (Shaftel et al., 2008). Par ailleurs, dans un modèle de gliome, la délétion du gène *Cx3cr1* chez les murins induit une accumulation de Mo inflammatoires qui surexpriment IL-1 $\beta$ . Cette surexpression est responsable de la croissance de la tumeur en activant la voie de signalisation MAPK P38 et l'expression de CCL2 dans les cellules tumorales (Feng et al., 2015).

Cependant les mécanismes par lesquels IL-1 $\beta$  induit la mort des neurones ne sont pas encore clairement élucidés. La plupart des études ont montré l'implication d'IL-1 $\beta$  dans la neuro-dégénérescence indirectement par l'utilisation de son inhibiteur naturel IL-1Ra. En effet, IL-1Ra réduit fortement la mort des neurones dans les modèles d'ischémie cérébrale (induite par une occlusion dans l'artère cérébrale) mais également dans les modèles d'injection de NMDA (N-methyl-D-aspartate) dans le cerveau à une dose toxique chez les rongeurs (Relton and Rothwell, 1992). De même, l'injection d'un anticorps bloquant anti-IL-1 $\beta$  dans l'intracérébroventriculaire diminue fortement les lésions induites par l'ischémie cérébrale. Ou encore la délétion du gène *Il-1Ra* entraînerait une augmentation des lésions

dans les modèles d'ischémie cérébrale (Boutin et al., 2001). Ces effets d'IL-1Ra dans les différents modèles indiquent le rôle fondamental d'IL-1 $\beta$  dans la mort des neurones.

Table 2 | **Neurological diseases to which interleukin-1 might contribute**

Disease	Clinical evidence of a role for IL-1	Proposed role of IL-1
Alzheimer's disease	Increased expression of IL-1 is associated with plaques and tangles in brain parenchyma; polymorphisms in genes encoding IL-1 influence susceptibility	Excessive production and processing of $\beta$ -amyloid precursor protein and phosphorylation of tau protein, the main components of plaques and tangles
Traumatic brain injury	Increased intracerebral expression of IL-1 early after injury, and increased concentration of IL-1 in cerebrospinal fluid	Increases neuronal excitability, induces neurotoxin production, increases leukocyte infiltration, activates microglial cells and promotes astrogliosis
Epilepsy	Increased expression of IL-1 in brain parenchyma; polymorphisms in genes encoding IL-1 might influence susceptibility	Increases neuronal excitability through modification of the balance between excitatory and inhibitory synaptic transmission
Parkinson's disease	Increased concentration of IL-1 in cerebrospinal fluid; polymorphisms in genes encoding IL-1 might influence susceptibility	Contributes to the degeneration of neurons in the substantia nigra
Stroke	Increased concentration of IL-1 in cerebrospinal fluid; polymorphisms in genes encoding IL-1 might influence susceptibility	Increases neuronal excitability, induces neurotoxin production, increases leukocyte infiltration, activates microglial cells and promotes astrogliosis

Figure 37: Implication d'IL-1 dans les différentes pathologies neuro-dégénératives.  
(Allan, Nat Immunology, 2005)

### 5-3-4 Les récepteurs de l'IL-1

Les activités biologiques de l'IL-1 $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  sont dépendantes du récepteur de type I (IL-1R1) de type Toll IL-1 récepteur (TIR). La liaison avec son ligand induit une modification de sa conformation, permettant le recrutement de la protéine accessoire (IL-1RAcP). Cette dernière possède également un domaine de type TIR au niveau intracellulaire (Dinarello, 2009); (Sims and Smith, 2010). Par ailleurs, il existe un autre récepteur à l'IL-1, IL-1R2 qui ne contient pas de domaine TIR intracellulaire. Les récepteurs IL-1R2 piége l'IL-1 $\beta$  qui n'est plus disponible pour se lier à l'IL-1R1 et se lie à l'IL-1RAcP qui ne pourra plus interagir avec IL-1R1. Ces 3 récepteurs peuvent être sécrétés sous forme de récepteurs solubles (sIL-1R1, sIL-1R2 et sIL-1RAcP) qui sont des inhibiteurs de la voie d'IL-1, ce qui confirme que la voie d'IL-1 est finement régulée (Allan et al., 2005).

La fixation de l'IL-1 $\beta$  sur l'IL-1R1 entraîne une réponse spécifique pour chaque type cellulaire. Cette cytokine stimule l'expression des protéines de l'inflammation comme la protéine C réactive (CRP) (Latkovskis et al., 2004), la synthèse de Ck pro-inflammatoires

(COX-2, IL-6, TNF $\alpha$ ) (Dinarello, 2002); (Garlanda et al., 2013) et de molécules d'adhérence par les cellules endothéliales permettant ainsi le recrutement des leucocytes ou le déclenchement de la fièvre au niveau cérébral (Sims and Smith, 2010); (Garlanda et al., 2013).

# **OBJECTIFS**

La DMLA constitue la première cause de cécité légale dans les pays industrialisés chez les personnes âgées (Friedman et al., 2004). Le stade précoce (MLA) se caractérise par la présence de larges « soft drusen » dans la macula et des anomalies pigmentaires dans l'EPR. Ce stade précoce peut évoluer vers une forme plus avancée: une forme atrophique (GA) caractérisée par une dégénérescence des photorécepteurs (PR) et de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) ou une forme humide définie par la présence de néovascularisations choroïdiennes.

La DMLA présente une composante inflammatoire caractérisée notamment par une accumulation de phagocytes mononucléés (PM) au niveau des lésions atrophiques dans l'espace sous-rétiniens au contact des PR et de l'EPR (Gupta et al., 2003) et la présence de nombreux médiateurs de l'inflammation dans les drusen (Johnson et al., 2000).

L'absence de modèle d'inflammation sous-rétinienne a longtemps limité l'étude de l'implication de ces phénomènes dans la DMLA. En 2007, notre laboratoire a montré que la déficience pour le récepteur *Cx3cr1* induisait la formation de dépôts de type « drusen like » sous rétiniens, ainsi qu'une accumulation de PM dans l'espace sous-rétinien en fonction de l'âge associée à une dégénérescence des PR (Combadiere et al., 2007).

Cependant, cette étude n'avait pas permis pas de discriminer si l'accumulation de PM trouvait son origine dans une migration/prolifération des cellules microgliales (CM) de la rétine interne et/ou un recrutement des monocytes (Mo) de la circulation sanguine.

L'objectif principal de l'article 1 était de déterminer l'origine des PM qui s'accumulent dans le modèle de souris déficientes en *Cx3cr1* et de déterminer quels PM sont responsables de la mort des PR. Parallèlement nous souhaitions déterminer si les PM déficients en *Cx3cr1* induisaient une dégénérescence plus importante parce qu'ils survivaient mieux dans l'espace sous-rétinien et/ou étaient également plus neurotoxiques.

Le deuxième objectif de ma thèse était de déterminer par quels mécanismes ces PM induisaient une neurotoxicité plus importante.

De nombreux mécanismes lient les PM activés à la neuro-dégénérescence. Parmi ceux ci, la voie de l'IL-1 $\beta$  pouvait être privilégiée et a donc été explorée prioritairement. En effet, la déficience de *Cx3cr1* dans le SNC entraîne une augmentation de la neurotoxicité des PM via une sécrétion importante de la cytokine IL-1 $\beta$  dans un modèle de Parkinson. Mais les mécanismes qui menaient à cette surexpression d'IL-1 $\beta$  en absence de CX3CR1 n'étaient pas déterminés. Ainsi, nous avons voulu déterminer si l'IL-1 $\beta$  était également impliquée dans notre modèle d'inflammation sous-rétinienne. Si l'iL-1 $\beta$  est réellement impliquée dans la neurotoxicité des PR, à quel niveau se joue la surexpression? Est ce que la déficience de

*Cx3cr1* dans les PM joue un rôle au niveau de la transcription du gène ou au niveau de la maturation et de la sécrétion d'IL-1 $\beta$ ?

Et enfin, le dernier objectif était de déterminer si l'inhibition d'IL-1 $\beta$  permettait de diminuer l'inflammation sous-rétinienne et de limiter la perte des PR dans notre modèle.

Le but de ce travail était de trouver des cibles thérapeutiques pour la forme sèche de la DMLA pour laquelle il n'existe aucun traitement à ce jour.

Durant ce travail, de nouvelles études ont confirmé l'implication des PM dans la mort des PR dans différents modèles de dégénérescence rétinienne (Kohno et al., 2013); (Cruz-Guilloty et al., 2013) et dans la régulation de la voie IL-1 par CX3CR1 (Feng et al., 2015).

# **RESULTATS**

## Article 1:

### **Le recrutement dans l'espace sous-rétinien de Mo CCR2+ est responsable de la dégénérescence des PR chez souris déficientes en Cx3cr1.**

Le premier objectif de ma thèse était de déterminer la toxicité des PM vis à vis des PR. Pour cela j'ai participé aux travaux qui ont permis de caractériser l'origine des PM accumulés dans l'espace sous-rétinien puis j'ai développé un test *ex vivo* pour quantifier la toxicité de différents types de PM et évaluer l'importance de leur génotype.

#### **Principaux résultats:**

##### Origine des PM sous-rétiniens:

Nous avons montré une augmentation significative de la concentration de CCL2 dans les humeurs aqueuses des patients atteints d'atrophie et qui est associée à la présence de cellules CCR2+/CD18 (qui correspondent aux Mo humain (Mantovani et al., 2004) dans l'espace sous-rétinien à proximité des zones atrophiques (Figure. 1).

De manière similaire, nous avons observé chez les souris *Cx3cr1<sup>-/-</sup>*, une surexpression de CCL2 avec l'âge (18 mois) et avec le modèle d'illumination (les souris sont illuminées avec une lumière verte à 4500 lux pendant 4 jours, qui déclenche une accumulation de PM sous-rétiniens en absence de perte initiale des photorécepteurs). CCL2 est principalement exprimé par les PM recrutés suggérant une boucle d'auto-amplification (Figure. 2).

Cette accumulation des PM dans l'espace sous-rétinien conduit à une dégénérescence secondaire des PR avec l'âge (12 mois) et avec le modèle d'illumination. Néanmoins, nous avons observé une diminution de 50 % des PM dans l'espace sous-rétinien chez les souris double knockout *Ccl2<sup>-/-</sup>Cx3cr1<sup>-/-</sup>* ou *Ccr2<sup>-/-</sup>Cx3cr1<sup>-/-</sup>* avec l'âge et expérimentalement au cours d'une illumination intense (Figure. 3).

Et en conséquence de cette diminution de PM dans l'espace sous-rétinien, nous avons constaté une forte inhibition de la dégénérescence des PR chez ces souris double knockout par rapport aux souris *Cx3cr1<sup>-/-</sup>* (Figure. 4).

Par ailleurs, l'administration de la lipo-chlodronate (qui permet d'éliminer les Mo circulants) réduit fortement l'infiltration des PM dans l'espace sous rétinien (de 50 %) et une inhibition totale de la dégénérescence des PR (Figure. 5).

Ces résultats suggèrent que c'est l'infiltration spécifique des Mo inflammatoires de la circulation qui est principalement responsable de la dégénérescence rétinienne observée chez ces souris déficientes en *Cx3cr1*.

Toxicité des PM déficients en *Cx3cr1*: (partie à laquelle j'ai contribué dans l'article)

Nous avons confirmé que les PM déficients en *Cx3cr1* sont effectivement plus neurotoxiques que les PM C57BL/6J ainsi que les CM sont moins toxiques que les Mo infiltrants de la circulation sanguine (Figure. 6). Pour démontrer cela, nous avons utilisé un modèle *ex vivo* de co-cultures. Les Mo de la moelle osseuse *Cx3cr1*<sup>-/-</sup> et C57BL/6J ou les CM *Cx3cr1*<sup>-/-</sup> et C57BL/6J (en nombre identique, 100 000 cellules par condition) sont en contact avec un explant rétinien pendant 18 h à 37°C et les rétines sont récupérées pour faire un marquage TUNEL (pour quantifier la mort des PR).

Ces résultats sont présentés en détail dans l'article ci-dessous « CCR2<sup>+</sup> monocytes infiltrate atrophic lesions in age-related macular disease and mediate photoreceptor degeneration in experimental subretinal inflammation in *Cx3cr1* deficient mice ».

## Article 2:

### **L'invalidation de *Cx3cr1* induit une surexpression de P2RX7 dans les phagocytes mononucléés responsable de l'augmentation de la sécrétion d'IL-1 $\beta$ et de la mort des photorécepteurs.**

La souris *Cx3cr1*<sup>-/-</sup> présente des dépôts de type « drusen like » sous rétiniens, ainsi qu'une accumulation de PM dans l'espace sous-rétinien en fonction de l'âge et qui est associée à une dégénérescence des PR (Combadiere et al., 2007). Les PM qui s'accumulent dans l'espace sous-rétinien proviennent au moins pour 50 % des Mo inflammatoires de la circulation sanguine. Ces Mo sont les principaux responsables de la dégénérescence des PR (Article 1). Les mécanismes moléculaires qui induisent la mort des PR ne sont pas encore connus. Il a été démontré que la déficience de CX3CR1 dans le SNC entraînait une augmentation de la neurotoxicité des PM par un mécanisme dépendant de la cytokine IL-1 $\beta$  dans un modèle de Parkinson (Cardona et al., 2006). Cependant les mécanismes qui mènent à cette surexpression d'IL-1 $\beta$  restent à élucider.

Dans cette étude nous avons donc décidé d'étudier si des Mo déficients pour *Cx3cr1*, les cellules responsables de la perte des PR (article 1), pouvaient secréter de plus grande quantité d'IL-1 $\beta$  et induire une neuro-dégénérescence. IL-1 $\beta$  est produit sous forme de proIL-1 $\beta$  qui doit être clivé par la caspase-1 après activation de l'inflammasome pour être sécrété. Les étapes clés de l'activation de l'inflammasome ont été comparées entre des souris contrôles et déficiente en *Cx3cr1* pour comprendre les mécanismes moléculaires responsables de la perte des PR.

#### **Principaux résultats:**

Tout d'abord, nous avons montré que l'absence de *Cx3cr1* chez les Mo de la moelle osseuse (BMM) conduit à une surexpression du P2RX7, une hausse de la sécrétion d'ATP et d'IL-1 $\beta$  (Figure. 1).

Pour ce faire, nous avons dans un premier temps évalué si l'absence de CX3CR1 pourrait jouer un rôle au niveau de la transcription du gène de l'IL-1 $\beta$ . Pour cela, nous avons mis en culture des BMM C57BL/6J et *Cx3cr1*<sup>GFP/GFP</sup> pendant 18 h en présence ou non de LPS. Il y a bien une augmentation de la transcription du gène de l'IL-1 $\beta$  en présence de LPS mais pas de différence entre les deux génotypes (Figure. 1A) suggérant que l'augmentation d'IL-1 $\beta$  observée n'est pas due à une transcription plus importante.

Ensuite pour déterminer si la déficience en *Cx3cr1* pourrait influencer la maturation de l'IL-1 $\beta$ , on a regardé l'expression du P2RX7 qui est connu pour être impliqué dans la neuro-

inflammation et dans l'assemblage de l'inflammasome. Par cytométrie en flux, nous avons observé une expression du P2RX7 deux fois plus importante chez les BMM  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  (Figure. 1B). Cette augmentation est corrélée avec une ouverture des pores P2RX7-dependants (Figure. 1C et D) plus importante qui pourrait permettre une plus grande sécrétion d'ATP dans le milieu extracellulaire (Figure. 1E). Afin de déterminer si cet ATP relargué par les BMM  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  est capable d'activer l'inflammasome *via* le P2RX7, nous avons dosé l'IL-1 $\beta$  qui sécrétée dans le surnageant par ELISA. On observe que la présence seule du LPS est suffisante pour induire la sécrétion d'IL-1 $\beta$  chez les BMM  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  alors qu'il faut la présence des deux signaux (LPS et ATP) pour induire la sécrétion d'IL-1 $\beta$  chez les BMM C57BL/6J (Figure. 1F, G et H).

Il a été démontré que la phagocytose de corps apoptotique riche en phosphatidylsérine induit l'expression de médiateurs anti-inflammatoires (Fadok et al., 1998). Les Mo circulants entrant dans l'espace sous-rétinien pourraient donc rapidement perdre leur capacité à sécréter de l'IL-1 $\beta$ . Nous avons ensuite différencié les BMM en PM sous-rétiniens. Pour cela, nous avons mis en culture des BMM C57BL/6J et  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  en présence de SE des PR (riche en phosphatidylsérine) pour mimer l'espace sous-rétinien.

En cohérence avec les effets anti-inflammatoires des SE des PR, les BMM C57BL/6J surexpriment Cd206 et IL-1Ra en présence des SE des PR mais de manière surprenante, cette augmentation n'est pas observée chez les BMM  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  (Figure. 2A et B). A l'inverse, l'expression du P2RX7 est augmentée chez les BMM  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  (Figure. 2C), tout comme la sécrétion d'ATP en présence des SE des PR (Figure. 2D). De même, en présence de SE des PR et du LPS, les BMM sécrètent significativement plus d'IL-1 $\beta$  que les BMM C57BL/6J (Figure. 2G).

Afin de confirmer ces résultats *in vivo*, nous avons étudié l'expression d'IL-1 $\beta$  et P2RX7 dans le modèle d'illumination qui induit une inflammation sous-rétinienne puis une neuro-dégénérescence des PR chez les souris  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$ . Nous avons tout d'abord montré une augmentation de la concentration d'IL-1 $\beta$  dans les homogénats de rétine des souris  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  après 4 jours d'illumination (Figure. 3B). Ensuite nous avons montré qu'après 4 jours d'illumination, ce sont les PM sous-rétinien (Ly6c positifs, les PM recrutés de la circulation sanguine) qui expriment principalement le P2RX7 et l'IL-1 $\beta$  dans la rétine (Figure. 3C et D). Ces résultats sont confirmés par les immunohistochimies des montages à plat des rétines qui montrent que les PM sous-rétiniens sont IL-1 et P2RX7 positifs alors que les CM résidentes qui se trouvent dans la CNI sont négatifs (Figure. 3E et F).

Et enfin, la neurotoxicité des BMM  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  est inhibée par le BBG (inhibiteur du P2RX7) et par l'IL-1Ra (inhibiteur de l'IL-1 $\beta$ ). Pour cela, nous avons d'abord utilisé le modèle *ex vivo* de co-cultures (BMM en contact avec un explant rétinien). Lorsque les BMM  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  sont prétraités avec de l'IL-1Ra ou avec du BBG, l'apoptose des PR est significativement plus faible que les BMM  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  non traités (Figure. 4A et B). Par ailleurs, l'ATP n'est pas directement lié à la mort des PR dans notre modèle (Figure. 4C et D). Ces résultats sont confirmés *in vivo* ou des injections intravitréennes de BBG ou de l'IL-1Ra conduisent à une inhibition de la dégénérescence des PR (Figure. 5).

Tous ces résultats sont présentés en détail dans l'article ci-dessous « Upregulation of P2RX7 in  $Cx3cr1$ -deficient mononuclear phagocytes leads to increased interleukine-1 $\beta$  secretion and photoreceptor neurodegeneration ».

# **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

Les travaux présentés ci-dessus démontrent une accumulation des PM dans l'espace sous-rétinien des yeux de patients atteints de DMLA au niveau des zones atrophiques. Nos résultats montrent que la déficience de *Cx3cr1* chez la souris entraîne une inflammation sous-rétinienne caractérisée par une accumulation de PM sous-rétiniens associée à une dégénérescence des PR. Nous avons montré que les souris *Cx3cr1*<sup>GFP/GFP</sup> (dont le gène *Cx3cr1* a été inactivé et remplacé par la GFP) surexpriment P2RX7 et IL-1 $\beta$  par les PM sous-rétiniens, ainsi que dans les PM cultivés *in vitro*. Et l'inhibition du P2RX7 par le BBG ou de l'IL-1 $\beta$  par l'IL-1Ra diminue efficacement la perte des PR *ex vivo* et *in vivo* dans le modèle de souris *Cx3cr1*<sup>GFP/GFP</sup>.

## I- Rôle du modèle d'inflammation sous-rétinienne dans la DMLA

### 1-1 Observations humaines

Les lésions atrophiques observées chez les patients atteints de GA contiennent de nombreux PM qui s'accumulent dans la rétine externe au contact des PR résiduels et de l'EPR adjacent à la lésion (Gupta et al., 2003); (Combadiere et al., 2007); (Sennlaub et al., 2013). Ces PM démontrent une morphologie activée et la présence de rhodopsine dans leur cytoplasme, suggérant qu'ils phagocytent les segments externes des PR (Gupta et al., 2003). Nos résultats montrent qu'au stade précoce de la maladie (MLA), des PM (positifs pour les marqueurs CD18 et IBA-1) sont déjà présents en grande quantité dans des drusen softs, en contact étroit avec l'EPR, démontrant que la MLA est associée à une altération du potentiel immunosuppressif de l'EPR (qui empêche en situation physiologique la présence de cellules immunitaires dans la rétine externe).

### 1-2 Modèle de souris déficientes en *Cx3cr1*

La déficience du récepteur CX3CR1 entraîne le développement avec l'âge, de symptômes caractéristiques de la DMLA atrophique, notamment par la présence de dépôts drusénoïdes et d'accumulation spontanée de PM dans l'espace sous-rétinien, associée à une dégénérescence secondaire des PR (Combadiere et al., 2007). La souris *Cx3cr1*<sup>GFP/GFP</sup> présente certaines caractéristiques communes avec les symptômes observés dans la DMLA. Cette souris est donc un excellent modèle pour tenter d'élucider les mécanismes permettant

la mise en place d'une inflammation sous-rétinienne chez l'homme. L'absence d'un polymorphisme de *Cx3cr1* associé à la survenue de la DMLA est cependant une limitation de ce modèle. En périphérie, il est démontré que CX3CL1/CX3CR1 est directement impliqué dans le recrutement, la migration et l'activation de cellules inflammatoires du sang vers le tissu lésé (Nishimura et al., 2002). Cet axe est notamment impliqué dans la pathologie de l'athérosclérose où CX3CL1 permet de recruter les Mo patrouilleurs qui sont CX3CR1<sup>high</sup> au niveau des plaques d'athérome. Ainsi, les souris déficientes en *Cx3cr1* montrent une diminution importante du nombre de PM infiltrants et une diminution de la formation des plaques d'athéromes (Combadiere et al., 2003); (Lesnik et al., 2003).

On aurait donc pu attendre un défaut de recrutement également chez les souris déficientes en *Cx3cr1* dans le SNC. Etonnamment CX3CL1/ CX3CR1 n'a pas du tout les mêmes effets en central ou en périphérie au regard des travaux établis dès le milieu des années 2000 (Combadiere et al., 2007); (Cardona et al., 2006).

### **1-3 Origine des PM impliqués dans la mort des PR (axe CCL2/CCR2)**

La présence de PM sous-rétiniens au stade précoce de la DMLA, en l'absence de toute dégénérescence rétinienne, suggère qu'une inflammation sous-rétinienne prolongée, au stade précoce de la maladie, pourrait participer à sa progression vers une GA. Différents travaux ont démontré que l'inhibition de l'infiltration de PM dans la rétine, grâce à une déplétion spécifique de Mo, protège les PR de lésions induites par le vieillissement par une illumination intense (Guo et al., 2012); (Kohno et al., 2013) indiquant que les Mo circulants jouent un rôle décisif dans la neurotoxicité des PR.

Nos travaux ont permis de mieux préciser l'origine et le rôle des différentes populations de PM sous-rétiniens (article 1). Nous avons mis en évidence que ces PM sous-rétiniens proviennent à 50 % des Mo inflammatoires de la circulation sanguine et sont recrutés dans la rétine sous le contrôle de l'axe CCL2/CCR2. Cette étude a démontré que la suppression de la signalisation CCR2, ou la délétion des Mo circulants, grâce à une injection systémique de lipo-chlodronate, réduit considérablement l'infiltration de PM dans l'espace sous-rétinien. De plus, l'absence d'inflammation sous-rétinienne protège les souris *Cx3cr1*<sup>GFP/GFP</sup> de la dégénérescence des PR induite lors du vieillissement, ou expérimentalement au cours d'une illumination intense (Article 1), ce qui confirme l'effet dramatique d'une inflammation prolongée au contact des PR.

## 1-4 Mécanisme de survie

Si ces expériences offrent une explication sur le recrutement des PM dans l'espace sous-rétinien des souris  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$ , ces travaux n'expliquent pas les mécanismes impliqués dans le maintien de cette inflammation, en dépit de l'environnement immunsupresseur contrôlé notamment par l'EPR.

Les travaux de notre équipe ont effectivement montré que ces PM  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  arrivent à mieux survivre dans l'espace sous-rétinien en altérant la clairance sous-rétinienne contrôlée par l'EPR (Levy et al., 2015) (article 3 annexe). Nous avons montré que la concentration d'ApoE est augmentée dans les yeux de souris  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  illuminées ou âgées et que la délétion d'ApoE (souris  $Cx3cr1^{GFP/GFP} ApoE^{-/-}$ ) abolissait l'accumulation des PM observées chez les souris  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$ . Ces résultats suggèrent que l'ApoE est nécessaire pour permettre la présence prolongée des PM dans l'espace sous-rétinien. Nous avons montré que la surexpression d'ApoE par les PM  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  stimule la sécrétion de l'IL-6 et que cette cytokine inhibe l'expression de FasL au niveau de l'EPR (impliqué dans la clairance de l'espace sous-rétinien) et promouvoit ainsi la survie des PM dans l'espace sous-rétinien (Levy et al., 2015) (voir annexe).

## 1-5 Modèle d'analyse *ex vivo*

Les travaux de notre laboratoire, mais également ceux du groupe de Ransohoff suggérait que les PM déficients en  $Cx3cr1$  présentaient également une neurotoxicité plus importante. Cependant, *in vivo*, il est très difficile de déterminer si la déficience de  $Cx3cr1$  induit une augmentation de la toxicité des PM ou si cette dégénérescence pourrait être expliquée par une accumulation des PM (*via* une survie plus importante) et par un recrutement plus important de PM (*via* une sécrétion augmentée de CCL2).

Pour répondre à cette problématique, nous avons mis au point un modèle *ex vivo* de co-cultures de PM en contact direct avec un explant rétinien (sans l'EPR). Le même nombre de BMM (100 000 cellules)  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  et C57BL/6J sont cultivés sur une membrane de polycarbonate et une rétine C57BL/6J est déposée avec les PR face aux BMM. Dans ce système, on ne s'intéresse qu'à la neurotoxicité des PM en supprimant les paramètres de l'apoptose induite par l'EPR et le recrutement des PM. Nous avons ainsi montré par marquage TUNEL, que l'apoptose des PR est plus importante lorsque les rétines sont en contact avec les PM  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  par rapport aux PM C57BL/6J confirmant ainsi qu'effectivement les PM  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  sont plus neurotoxiques (Article 2) en plus de leur capacité de survie accrue (article 3 en annexe) et de leur potentiel accru d'attirer de nouveaux Mo (article 1).

Les résultats obtenus *ex vivo*, à l'aide de ce modèle, pourraient être artéfactuel (activation et polarisation des PM non représentatives de la situation pathologique). Les mécanismes caractérisés ont été donc été confirmés par la suite systématiquement *in vivo* avec notre modèle *in vivo* d'illumination.

## II- Mécanismes impliqués dans la mort des photorécepteurs

### 2-1 IL-1 $\beta$

Cardona et ses collaborateurs (Cardona et al., 2006) ont montré dans un modèle de Parkinson et de sclérose latérale amyotrophique que la déficience en CX3CR1 induisait un défaut de migration des CM au niveau de la lésion et une augmentation de la mort neuronale. Cette neurotoxicité plus importante semble liée à la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les CM. Cependant, l'étude ne montre pas si l'IL-1 $\beta$  est bien responsable de la mort des neurones, ni quels sont les mécanismes de cette sécrétion d'IL-1 $\beta$  plus importante chez les PM Cx3cr1<sup>GFP/GFP</sup>.

Le deuxième objectif de ma thèse était donc de déterminer si l'IL-1 $\beta$  était impliqué dans notre modèle d'inflammation sous-rétinienne. Si l'IL-1 $\beta$  était réellement impliquée dans la neurotoxicité des PR, à quel niveau se jouait la surexpression?

Le gène *IL-1 $\beta$*  est transcrit après activation des TLR (Allan et al., 2005), il faut ensuite un second stimulus, comme l'activation des récepteurs P2X7 avec de l'ATP extracellulaire (lors d'une inflammation) pour induire l'assemblage du complexe NLRP3/ASC pour obtenir la forme mature d'IL-1 $\beta$  (Mariathasan et al., 2006).

Nos résultats démontrent que les BMM Cx3cr1<sup>GFP/GFP</sup> surexpriment plus de P2RX7 à la surface de la membrane associée à un plus grand nombre de canaux pannexines ouverts (par influx de To-pro dans les BMM). De plus, nous avons montré que les BMM Cx3cr1<sup>GFP/GFP</sup>, qui sécrètent plus d'ATP, ont l'inflammasome plus activé et une sécrétion d'IL-1 $\beta$  plus importante. En effet, contrairement aux BMM C57BL/6J, qui ont besoin de l'activation des TLR et du P2RX7 (les deux signaux), une simple stimulation des TLR (par le LPS) est suffisante pour induire la sécrétion d'IL-1 $\beta$  chez les BMM Cx3cr1<sup>GFP/GFP</sup>. Cette sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les BMM Cx3cr1<sup>GFP/GFP</sup> est influencée par une sécrétion plus importante d'ATP et peut être inhibée avec un antagoniste du P2RX7.

Ces données suggèrent que les BMM sont capables d'auto-activer leur inflamasome dépendamment de la voie ATP/P2RX7 et leur plus grande sensibilité à l'ATP exogène pourrait expliquer l'augmentation de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  lors d'inflammations stériles.

De manière similaire, ces résultats pourraient expliquer l'augmentation d'IL-1 $\beta$  dans le cerveau (Cardona et al., 2006) et dans le modèle d'illumination chez les souris déficientes en  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  associée avec une accumulation de PM. De plus, nos résultats sont en accord avec les données publiées précédemment par l'équipe montrant également une augmentation de la protéine IL-1 $\beta$  chez les souris déficientes en  $Cx3cr1$  avec l'âge (Lavalette et al., 2011).

Par ailleurs, ces résultats sont confortés par une étude publiée récemment qui montre que, dans un modèle de gliome, la délétion du gène  $Cx3cr1$  chez les murins induit une accumulation de Mo inflammatoires qui surexpriment IL-1 $\beta$ . Cette surexpression est responsable de la croissance de la tumeur en activant la voie de signalisation MAPK p38 et l'expression de CCL2 dans les cellules tumorales (Feng et al., 2015).

Il serait par ailleurs intéressant de déterminer si l'IL-1 $\beta$  agit directement sur la mort des PR ou de manière indirecte. Au niveau de la rétine, IL-1R est principalement exprimé par les cellules de Müller (Chen et al., 2014). Il est possible que l'IL-1 $\beta$  sécrétée par les PM sous-rétiniens active les cellules de Müller et dérègle l'expression de récepteurs responsables (GLAST) responsable de la recapture du glutamate extracellulaire. L'excitotoxicité induite par le glutamate est impliquée dans de nombreuses pathologies oculaires telles que l'ischémie rétinienne, le glaucome ou encore la rétinopathie diabétique (Ishikawa, 2013). Dans ces pathologies, les neurones de la CCG et de la CNI sont les principales cibles de l'excitotoxicité du glutamate. Cependant il est possible que, dans le cas d'inflammation sous-rétinienne, l'augmentation locale du glutamate participe à la dégénérescence des PR.

## 2-2 ATP direct/indirect

Bien que P2RX7 soit uniquement présent aux niveaux des sites synaptiques dans la couche plexiforme externe par immunohistochimie (Brandle et al., 1998a); (Niyadurupola et al., 2013), Notmi et al ont suggéré que l'ATP pourrait également induire directement l'apoptose des PR par un mécanisme P2RX7-dépendant (Notomi et al., 2011). Nos résultats montrent que chez les souris  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  illuminées, le P2RX7 est principalement localisé au niveau des PM sous-rétiniens et nous n'avons observé aucune différence d'apoptose des PR lorsque les PM étaient en présence de rétines C57BL/6J ou  $P2rx7^{-/-}$ . De plus, le Bz-ATP (100  $\mu$ M) n'a pas eu d'effet sur la mort des PR *ex vivo* en absence de PM.

Ces travaux suggèrent que l'apoptose des PR observée dans nos modèles serait plutôt due à un effet indirect de l'ATP activerait les BMM  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  via P2RX7. Ceci est confirmé par l'inhibition totale de la toxicité des BMM  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  avec le BBG dans le modèle de co-cultures. Nos résultats sont confortés par une étude montrant que l'ATP et le Bz-ATP induiraient une mort neuronale chez le rat mais seulement en présence de PM et l'absence du P2RX7 à la surface des PM inhiberait également la mort des neurones même en présence d'ATP (Skaper et al., 2006). De même, Ancassi et ses collaborateurs ont montré que l'ATP à 3 mM n'a pas d'effet sur la mort des neurones aviaires en culture mais seulement dans les cultures mixtes (neurones et cellules gliales). Ces auteurs observent même une augmentation de la viabilité lorsque les neurones sont traités avec 0.1 mM de BzATP.

Par ailleurs, il semble peu probable que l'ATP puisse exercer son effet toxique *in vivo* du fait de la forte présence d'ectonucléotidases dans le milieu extracellulaire. En effet, lorsque la concentration d'ATP augmente dans le milieu extracellulaire, les NTPDase 1 (CD39) sont capables d'hydrolyser très rapidement l'ATP et l'ADP en AMP et empêcher ainsi les effets délétères d'ATP (Levesque et al., 2010); (Robson et al., 2006).

Nos données *in vitro* suggèrent que la neurotoxicité des PM  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  pourrait être expliquée par la sécrétion spontanée de l'ATP par les PM et par une plus sensibilité à l'ATP extracellulaire (surexpression de P2RX7).

Dans la pathologie humaine, il a été montré que les patients atteints de DMLA humide présentaient une augmentation de la concentration d'ATP dans le vitré (Notomi et al., 2013). De même, il est pensable que l'apoptose des PR dans la GA libère une grande quantité d'ATP qui pourrait activer les PM sous-rétiniens humains et induire une sécrétion d'IL-1 $\beta$ .

Une des questions que nous nous sommes posés également est la provenance de l'ATP pour activer les PM dans l'espace sous-rétinien. Nos résultats ont montré que les PM déficients en  $Cx3cr1$  sont capables de sécréter une grande quantité d'ATP grâce à la formation de pores. Cependant, les neurones en dégénérescence peuvent également libérer de l'ATP dans le milieu extracellulaire pour activer les PM. Pascual et ses collaborateurs ont montré que les CM pouvaient sécréter de petites quantités d'ATP dans le milieu extracellulaire aidant au recrutement des astrocytes via le récepteur P2Y1R (Pascual et al., 2012). Les astrocytes amplifiaient le signal en sécrétant de l'ATP, participant au recrutement de nouveaux CM.

## 2-3 Maintien du phénotype pro-inflammatoire

Dans l'espace sous-rétinien, les Mo circulants se différencient en PM dans un environnement riche en phosphatidylsérine en contact avec les SE des PR. Il a été démontré que la phagocytose de corps apoptotiques riches en phosphatidylsérine induirait l'expression des médiateurs anti-inflammatoires (Fadok et al., 1998).

Nos résultats montrent qu'à l'inverse des BMM C57BL/6J, les BMM *Cx3cr1*<sup>GFP/GFP</sup> inhibent leur expression de gènes anti-inflammatoires comme CD206 et IL-1Ra lorsqu'ils se différencient en présence de SE des PR. De plus, ces SE n'inhibent pas la capacité des BMM *Cx3cr1*<sup>GFP/GFP</sup> à sécréter de l'ATP.

Ces résultats confirment que le récepteur CX3CR1 permet de maintenir les PM dans un état quiescent dans le SNC (Zujovic et al., 2001); (Cardona et al., 2006) et que sa déficience empêche la polarisation de ces PM vers un phénotype de type M2 anti-inflammatoire. De même, Zujovic et ses collaborateurs ont montré que la CX3CL1 pourrait agir comme une chimiokine anti-inflammatoire dans le SNC par sa capacité à réprimer l'activation des CM (Zujovic et al., 2001).

Il serait ainsi intéressant d'induire des PM vers un phénotype anti-inflammatoire en traitant avec des Ck anti-inflammatoires comme IL-10, IL-4, TGF $\beta$  ou encore CX3CL1.

## 2-4 Autres voies

Le modèle de souris *Cx3cr1*<sup>GFP/GFP</sup> nous a donc permis de démontrer qu'IL-1 $\beta$  pourrait être potentiellement impliquée dans la mort des PR lors d'une inflammation sous-rétinienne chronique comme dans la pathologie de la DMLA. L'inhibition de l'IL-1 $\beta$  et du P2RX7 permet de diminuer significativement la dégénérescence des PR *ex vivo* et *in vivo*. Cependant, même avec une concentration très importante d'IL-1Ra (10 mg/ml), nous n'avons pas réussi à inhiber totalement la mort des PR, ce qui suggère que d'autres voies pourraient être impliquées dans cette dégénérescence. Plusieurs voies de neurotoxicité ont été suggérées ou démontrées dans la rétine, en particulier pour les neurones de la CNI ou de la CCG.

Le TNF $\alpha$  est surexprimé dans de nombreuses pathologies neurodégénératives telles que la sclérose en plaque, la maladie de Parkinson ou encore la maladie d'Alzheimer (McCoy and Tansey, 2008). Il a notamment été montré que l'inhibition de la voie CX3CL1/CX3CR1 au niveau des CM induirait une augmentation de la sécrétion du TNF $\alpha$  en réponse à un stimulus inflammatoire et qui serait impliqué dans la mort des neurones (Zujovic et al., 2001). TNF $\alpha$  joue également un rôle important dans la dégénérescence des CG dans la pathologie du glaucome. Nakazawa et ses collaborateurs ont également montré, que la déficience de

TNF $\alpha$  ou de son récepteur TNF-R2 inhibait le recrutement des Mo CD11b+ et ainsi que la mort des PR dans un modèle de décollement rétinien chez la souris (Nakazawa et al., 2011). Toutefois, son rôle dans la dégénérescence des PR reste plus controversé, du fait de l'effet balance entre son récepteur TNF-R1 et TNF-R2 (Fontaine et al., 2002).

Le monoxyde d'azote (NO) semblerait plutôt être impliqué dans la dégénérescence des neurones de la CNI comme dans la pathologie de la rétinopathie diabétique (Sennlaub et al., 2002).

Les ROS sont fortement impliqués dans l'induction de l'IL-1 $\beta$  et inversement (Hsu and Wen, 2002); (Ahmad et al., 2009). De plus, les ROS sont impliqués dans de nombreuses pathologies, en particulier dans les troubles liés à l'âge. En effet, la rétine est particulièrement sensible au stress oxydant en raison de sa haute consommation d'oxygène, la proportion élevée d'acides gras polyinsaturés, et son exposition à la lumière visible (Jarrett and Boulton, 2012); (Beatty et al., 2000).

Nous avons donc testé différents inhibiteurs pharmacologiques (Ethanercept pour inhiber la voie TNF $\alpha$ , L-NAME pour inhiber NOS, Cu-DIPS et DPI pour inhiber le stress oxydant) pour essayer d'identifier les autres voies impliquées dans la mort des PR avec notre modèle *ex vivo*. Aucun des inhibiteurs n'a permis de protéger les PR de l'apoptose induite par les PM. D'autres études seront donc nécessaires pour évaluer les autres voies impliquées dans la dégénérescence des PR. Comme évoqué ci-dessus, il serait intéressant d'étudier l'effet du glutamate sur les PR dans notre modèle *via* les cellules de Müller et de déterminer si cette voie est impliquée dans la dégénérescence des PR (étude en cours).

## III- Thérapies

### 3-1 Les anti-P2RX7

*In vivo*, nous avons montré que P2RX7 et IL-1 $\beta$  sont fortement exprimés par les PM sous-rétiniens dans le modèle d'illumination chez les souris *Cx3cr1<sup>GFP/GFP</sup>*. Les injections intravitréennes de BBG ont inhibé l'apoptose des PR tout comme dans les modèles d'hémorragies sous-rétiniennes (Notomi et al., 2013), dans le glaucome (Niyadurupola et al., 2013) ou encore dans l'ischémie cérébrale (Sugiyama et al., 2010). Le BBG est un colorant alimentaire bleu de taille relativement petite (854 Da) qui est déjà couramment utilisé pendant les opérations ophtalmiques pour visualiser la membrane limitante interne (Naithani et al., 2011).

Le BBG est plus efficace pour inhiber la mort des PR *in vivo*. Ceci pourrait être dû à sa petite taille par rapport à l'IL-1Ra qui fait 17 KDa, ce qui lui permet de diffuser plus facilement après l'injection dans le vitré.

De manière surprenante, contrairement à la neuro-inflammation observée lors d'une ischémie cérébrale (Yu et al., 2013), l'inhibition de P2RX7 n'a pas influencé l'accumulation des PM  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$ , sous-entendant que l'ATP ne contribuerait pas de façon significative aux recrutements des PM dans ce modèle.

Kerur et al. ont montré dans la GA, que l'accumulation de l'ARN Alu due à une déficience de DICER1 induit une sécrétion d'IL-18 *via* l'inflammasome NLRP3. Cette cytokine induirait une dégénérescence très importante des cellules de l'EPR et l'utilisation d'un inhibiteur de P2RX7, le A-740003 réduit fortement la perte des cellules de l'EPR (Kerur et al., 2013). De même, dans la pathologie de Parkinson, l'injection d'un inhibiteur de P2RX7, le A-438079 dans le striatum empêche la mort des neurones dopaminergiques, une gliose et une toxicité synaptique (Carmo et al., 2014).

L'utilisation des nombreux inhibiteurs du P2RX7 (BBG, A-438079, A-740003) pourraient être un excellent outil thérapeutique pour lutter contre des pathologies comme l'atrophie géographique, où les Mo inflammatoires s'accumulent.

## 3.2 Pannexines

Nous avons montré également que les PM  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  ont une perméabilité cellulaire plus importante que les PM C57BL/6J. Nous n'avons pas démontré si la formation des pores observés était dépendante ou indépendante des pannexines.

Certains auteurs ont suggéré que le P2RX7 pouvait lui-même se dilater pour former le pore ou que le P2RX7 interagissait avec d'autres canaux non encore identifiés (Hanley et al., 2012); (Rigato et al., 2012); (Xu et al., 2012); (Alberto et al., 2013). Ainsi, il a été montré la présence de pores même lorsque la protéine pannexine-1 était déficiente (Bond and Naus, 2014).

Cependant la majorité de la littérature montre que, si l'activation du P2RX7 perdure dans le temps, elle induit la formation des pores *via* la pannexine-1 (Bond and Naus, 2014); (Makarenkova and Shestopalov, 2014); (Pelegrin and Surprenant, 2006) permettant l'entrée cytoplasmique de facteurs extracellulaires pouvant par exemple activer l'inflammasome (Pelegrin and Surprenant, 2006); (Ferrari et al., 2006). Les pannexines peuvent également former des canaux permettant la sécrétion de petites molécules jusqu'à 900 Da comme l'ATP (Iglesias et al., 2008) et le Yo-pro qui est un marqueur fluorescent (Smart et al., 2003); (Bartlett et al., 2013). Il a été suggéré que la pannexine-1 était indispensable à la formation des pores avec le P2RX7 (Locovei et al., 2007); (Pelegrin and Surprenant, 2006).

De ce fait, d'autres expériences seront nécessaires pour déterminer si l'activation de l'inflamasome et la sécrétion d'ATP se fait réellement *via* les canaux pannexines, ou *via* d'autres protéines membranaires non encore identifiées ou encore *via* le P2RX7 lui-même (Alberto et al., 2013). Pour cela, il existe de nombreux inhibiteurs pharmacologiques efficaces et spécifiques pour bloquer les pannexines.

Le carbexolone, qui est un synthétique dérivé de l'acide glycyrhhétinique, est utilisé depuis plus de 25 ans pour bloquer de manière réversible les canaux pannexines (Bruzzone et al., 2005).

Le probénécide (utilisé pour traiter les symptômes de la goutte) permet également d'inhiber les pannexines sans inhiber les canaux connexines même à une forte concentration (Silverman et al., 2008).

Et enfin le peptide mimétique <sup>10</sup>Panx1 qui cible la première boucle extracellulaire de la pannexine1 qui empêche le passage des petites molécules comme l'ATP (Pelegrin and Surprenant, 2006). Mais cet effet peut être reproduit par d'autres peptides de la même taille (1500 Da) suggérant que <sup>10</sup>Panx1 n'aurait pas un effet spécifique sur la boucle extracellulaire (Dahl, 2007).

Si les pannexines sont impliquées dans la sécrétion d'ATP par les PM ces molécules pourraient avoir un intérêt thérapeutique dans le traitement des GA en bloquant la neurotoxicité des PM sous-rétiniens.

### **3.3 Les anti-IL1 dans les autres pathologies dont test behçet**

Les traitements anti-IL-1 sont encore peu utilisés aujourd'hui dans les pathologies oculaires mais nous disposons d'un large éventail thérapeutique utilisé dans les pathologies inflammatoires. Les différents inhibiteurs utilisés sont l'anakinra qui est un inhibiteur du récepteur IL-1, le Canakinumab qui est un anti-IL-1 $\beta$  et le Gevokizumab qui est un recombinant humanisé anti-IL-1 $\beta$  (Caso et al., 2014). Les traitements anti-IL-1 $\beta$  semblent prometteurs pour traiter la pathologie de Behçet ou l'IL-1 $\beta$  est fortement augmentée dans le sérum des patients atteints de Behçet et dont les manifestations ophtalmologiques sont dominées par les uvéites (Caso et al., 2014).

### 3.4 Anti-IL-1 + anti-IL-6 ou anti-CD14

On a vu que les PM sous-rétiniens, déficients pour *Cx3cr1*, sont plus neurotoxiques et survivent mieux dans l'espace sous-rétinien. Il sera donc intéressant de combiner un anti-IL1 $\beta$  pour inhiber la neurotoxicité des PM et un anti-IL-6 pour inhibiter la survie des PM (Levy et al., 2015). De manière plus globale, l'inhibition de l'activation des PM via les TLR semble prometteuse au vu du travail de notre équipe. A ce titre l'utilisation d'un anti-CD14 (Levy et al., 2015) pourrait permettre d'inhiber à la fois la survie et la toxicité des PM sous-rétiniens.

L'ensemble de ces résultats pourrait expliquer la hausse de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  visualisée chez les PM *Cx3cr1*<sup>GFP/GFP</sup> (Cardona et al., 2006). Nous suggérons que l'inhibition de P2RX7 pourrait diminuer l'inflammation sous-rétinienne et ainsi permettre une protection des PR comme dans la pathologie de la GA où des PM sous-rétiniens accumulent (Figure. 38) (Sennlaub et al., 2013). La figure 39 récapitule les différents mécanismes de recrutement, de survie et de neurotoxicité induits par les PM déficients en *Cx3cr1* dans l'espace sous-rétinien.

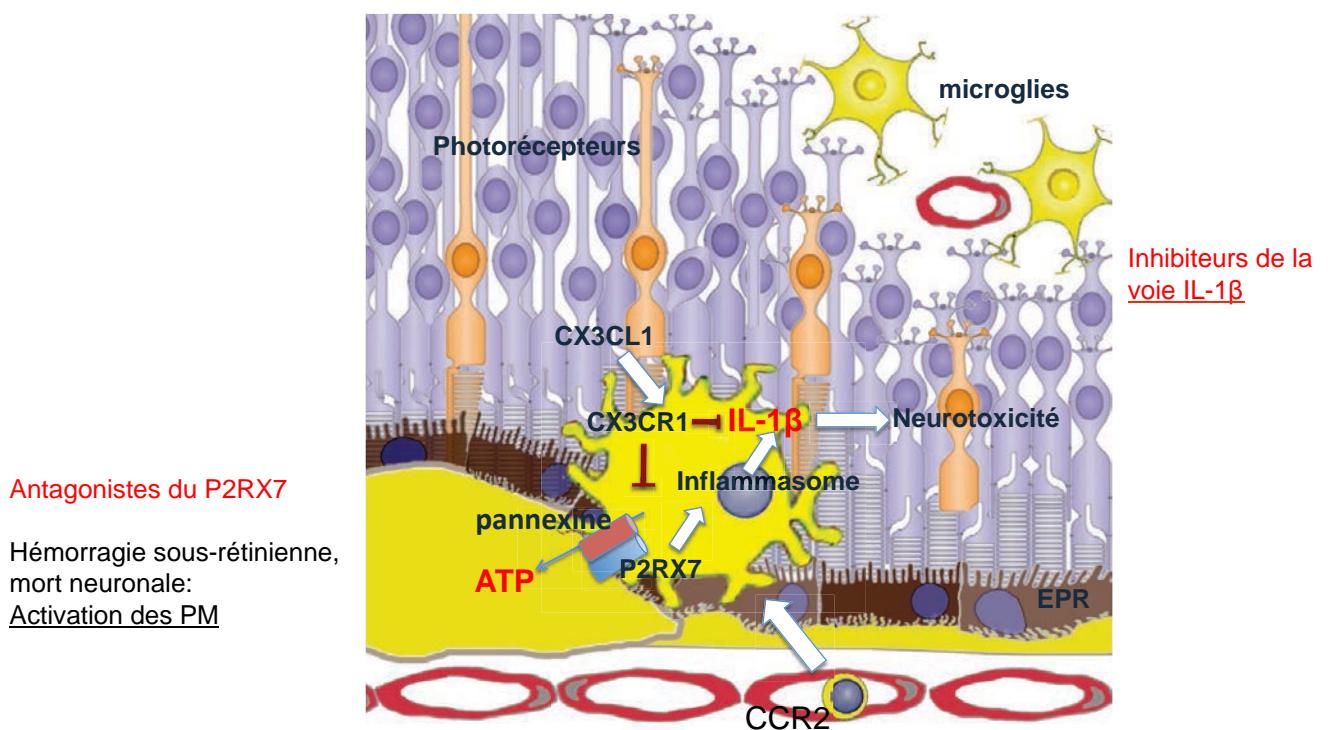


Figure 38: Modèle de toxicité des photorécepteurs par les phagocytes mononucléés *Cx3cr1*<sup>-/-</sup> sous-rétiniens.

L'invalidation de *Cx3cr1* chez PM induit une surexpression de P2RX7, une augmentation de la sécrétion d'ATP et une augmentation de l'activation de l'inflammasome ce qui conduit à une sécrétion plus importante d'IL-1 $\beta$ . La neurotoxicité des PM sous-rétiniens peut être inhibée par des antagonistes du P2RX7 et d'IL-1 $\beta$ .

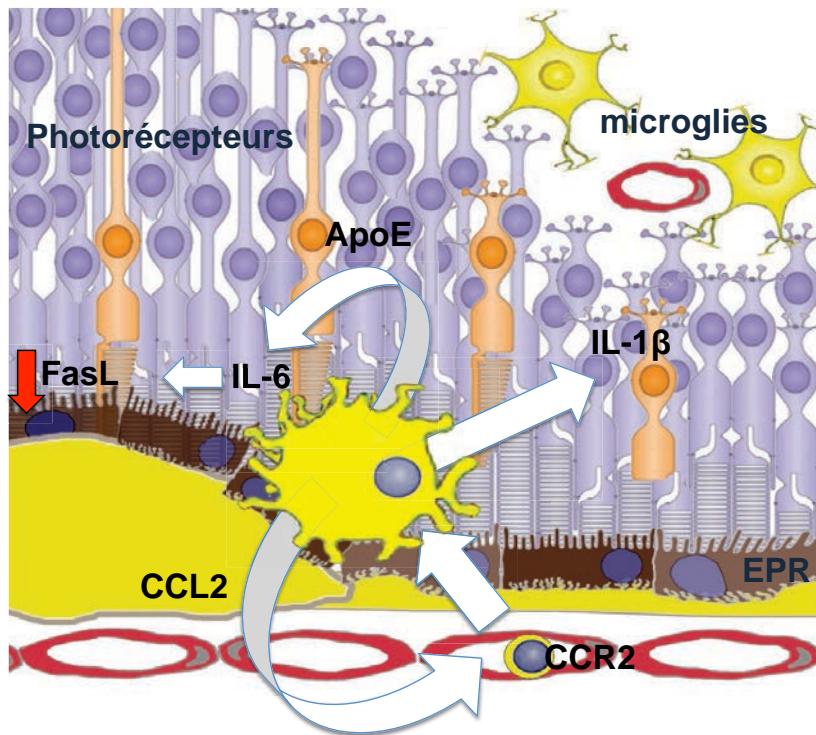


Figure 39: Mécanismes de survie et de neurotoxicité des phagocytes mononucléés  $Cx3cr1^{-/-}$  sous-rétiniens.

L'invalidation de  $Cx3cr1$  dans PM sous-rétiniens induit une surexpression d'ApoE qui va stimuler la sécrétion d'IL-6. Cette cytokine va inhiber l'expression de FasL au niveau de l'EPR et promouvoir ainsi sa survie. Les PM  $Cx3cr1^{-/-}$  surexpriment également plus de CCL2 pour recruter des Mo inflammatoires CCR2+, et induisent une neurotoxicité plus importante via une sécrétion exacerbée d'IL-1 $\beta$ .

## IV- Perspectives générales: les autres modèles

Le modèle  $Cx3cr1^{GFP/GFP}$  a été utilisé en tant que modèle d'inflammation car ces souris présentent une neurotoxicité des PM sous-rétiniens plus importante (Sennlaub et al., 2013). Il était ainsi plus judicieux de d'abord tester des inhibiteurs sur un modèle de souris avec un phénotype marqué pour pouvoir observer les effets des différentes molécules pharmacologiques sur l'inhibition de la dégénérescence des PR. Cependant, les polymorphismes qui affectent la fonction du gène  $cx3cr1$  ne représentent pas un facteur de risque pour la DMLA indiquant que ces souris ne peuvent pas modéliser l'intégralité de la physiopathologie de la DMLA.

Nos expériences ex vivo ont démontré que les BMM C57BL/6J de souris possèdent également une neurotoxicité vis-à-vis des PR. La question des voies de toxicité de ces BMM pourrait donc se poser mais semble assez peu pertinente de la physiopathologie humaine. Comme nous l'avons montré, les complications inflammatoires liées à la DMLA sont dues à

une dérégulation des mécanismes de recrutement, d'élimination ou de polarisation des MP sous-rétiniens. Ces dérégulations sont le résultat de facteurs environnementaux (tabagisme, obésité, exposition à la lumière) ou génétiques (variation allélique du système du complément, de métabolisme des lipides). Chez la souris C57BL/6J de laboratoire qui ne porte aucun variant allélique et élevé dans des conditions contrôlées, les PM sous-rétiniens sont rapidement éliminés par la capacité immunosuppressive de l'EPR et leur toxicité intrinsèque ne s'exprime pas. De façon similaire, chez l'humain, on peut estimer que l'accumulation de PM sous-rétiniens ne peut se faire qu'en présence de conditions environnementales et/ou génétiques qui modifient suffisamment la polarisation des PM pour leur permettre de survivre. La question de la toxicité doit donc plus vraisemblablement se poser pour des PM ayant acquis la capacité à survivre sur un EPR que pour des PM « C57BL/6J ».

Pour affiner davantage la connaissance du rôle de la neuro-inflammation dans la pathologie de la DMLA, nous prévoyons d'utiliser d'autres modèles d'inflammation sous-rétinienne.

## 4-1 CCR1/CCR5

Les souris invalidées pour les récepteurs CCR1 et CCR5 présentent une accumulation de PM sous-rétiniens avec l'âge et nous avons observé une dégénérescence plus importante des PR par rapport aux souris C57BL/6J avec un modèle de décollement rétinien ou d'injection rétinienne de PM (travaux en cours). Il sera donc intéressant de comparer les mécanismes de neurotoxicité de ces PM. Dans un premier temps nous prévoyons d'étudier l'expression de P2RX7, IL-1 $\beta$  et la sécrétion d'ATP des PM invalidés pour *Ccr1* ou *Ccr5*. Si aucune différence n'est observée, leurs transcriptomes seront comparés à celui des souris C57BL/6J et *Cx3cr1*<sup>-/-</sup> pour mieux comprendre les bases moléculaires des mécanismes d'activation et de neurotoxicité de ces PM.

## 4-2 ApoE

ApoE est une apolipoprotéine qui est notamment impliquée dans le transport du cholestérol. Il existe chez l'homme, trois isoformes d'ApoE. L'expression de l'allèle E4 confère une protection relative par rapport à l'allèle E3 qui est la forme neutre et majoritaire, tandis que les personnes porteuses de l'allèle E2 ont davantage de risques de développer une DMLA (McKay et al., 2011). L'invalidation d'*ApoE* permet de récupérer le phénotype rétinien des souris (article 3 en annexe). Pour évaluer les différentes isoformes humaines dans la mise en place d'une inflammation sous-rétinienne, notre laboratoire a analysé le phénotype de

souris humanisées, dont le gène *ApoE* murin est remplacé par les allèles humains E2, E3 et E4.

Les souris porteuses de l'allèle ApoE2 présentent une accumulation des PM dans l'espace sous-rétinien avec l'âge ou avec le modèle d'illumination liée à un défaut d'élimination des PM (article 4 en annexe) mais sont associées à une dégénérescence moindre que les souris déficientes en *Cx3cr1*.

Nos résultats préliminaires montrent que l'inhibition des P2RX7 par le BBG diminue significativement la dégénérescence des PR *in vivo* avec le modèle expérimental d'illumination. Des études supplémentaires seront nécessaires pour établir si l'IL-1 $\beta$  est également impliquée dans la mort des PR et déterminer si les PM ApoE2 expriment plus de P2RX7, s'ils sécrètent plus d'ATP et si l'inflamasome est activé.

### 4-3 Humain

*In fine*, nous prévoyons dès que cela sera possible d'étudier les Mo de la circulation sanguine des patients atteints de DMLA pour déterminer si l'IL-1 $\beta$  est également impliquée chez l'humain. Il serait intéressant de comparer les Mo de la circulation des patients atteints de la DMLA avec les Mo des sujets sains et de regarder la sécrétion d'IL-1 $\beta$  ainsi que la sécrétion d'ATP et l'expression du P2RX7.

Nos premiers résultats montrent que les Mo humains (de sujet sain) en contact avec un explant rétinien induisent une toxicité vis-à-vis des PR et lorsqu'ils sont inhibés avec de l'IL-1Ra, nous observons une diminution de la perte des PR.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Abbracchio, M.P., and G. Burnstock. 1994. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacology & therapeutics*. 64:445-475.
- Abbracchio, M.P., G. Burnstock, J.M. Boeynaems, E.A. Barnard, J.L. Boyer, C. Kennedy, G.E. Knight, M. Fumagalli, C. Gachet, K.A. Jacobson, and G.A. Weisman. 2006. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological reviews*. 58:281-341.
- Adinolfi, E., M.G. Callegari, M. Cirillo, P. Pinton, C. Giorgi, D. Cavagna, R. Rizzuto, and F. Di Virgilio. 2009. Expression of the P2X7 receptor increases the Ca<sup>2+</sup> content of the endoplasmic reticulum, activates NFATc1, and protects from apoptosis. *J Biol Chem*. 284:10120-10128.
- Agostini, L., F. Martinon, K. Burns, M.F. McDermott, P.N. Hawkins, and J. Tschoopp. 2004. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*. 20:319-325.
- Ahmad, R., J. Sylvester, M. Ahmad, and M. Zafarullah. 2009. Adaptor proteins and Ras synergistically regulate IL-1-induced ADAMTS-4 expression in human chondrocytes. *J Immunol*. 182:5081-5087.
- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124:783-801.
- Alberto, A.V., R.X. Faria, C.G. Couto, L.G. Ferreira, C.A. Souza, P.C. Teixeira, M.M. Froes, and L.A. Alves. 2013. Is pannexin the pore associated with the P2X7 receptor? *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 386:775-787.
- Allam, R., M.N. Darisipudi, K.V. Rupanagudi, J. Lichtnekert, J. Tschoopp, and H.J. Anders. 2011. Cutting edge: cyclic polypeptide and aminoglycoside antibiotics trigger IL-1beta secretion by activating the NLRP3 inflammasome. *J Immunol*. 186:2714-2718.
- Allan, S.M., and N.J. Rothwell. 2001. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2:734-744.
- Allan, S.M., P.J. Tyrrell, and N.J. Rothwell. 2005. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nature reviews. Immunology*. 5:629-640.
- Allavena, P., and A. Mantovani. 2012. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clinical and experimental immunology*. 167:195-205.
- Ambati, J., B.K. Ambati, S.H. Yoo, S. Ianchulev, and A.P. Adamis. 2003a. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol*. 48:257-293.
- Ambati, J., A. Anand, S. Fernandez, E. Sakurai, B.C. Lynn, W.A. Kuziel, B.J. Rollins, and B.K. Ambati. 2003b. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med*. 9:1390-1397.
- Amstrup, J., and I. Novak. 2003. P2X7 receptor activates extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 independently of Ca<sup>2+</sup> influx. *The Biochemical journal*. 374:51-61.
- Anccasi, R.M., I.M. Ornelas, M. Cossenza, P.M. Persechini, and A.L. Ventura. 2013. ATP induces the death of developing avian retinal neurons in culture via activation of P2X7 and glutamate receptors. *Purinergic signalling*. 9:15-29.
- Anderson, D.H., R.F. Mullins, G.S. Hageman, and L.V. Johnson. 2002. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol*. 134:411-431.
- Anderson, D.H., S. Ozaki, M. Nealon, J. Neitz, R.F. Mullins, G.S. Hageman, and L.V. Johnson. 2001. Local cellular sources of apolipoprotein E in the human retina and retinal pigmented epithelium: implications for the process of drusen formation. *Am J Ophthalmol*. 131:767-781.
- Arnold, L., A. Henry, F. Poron, Y. Baba-Amer, N. van Rooijen, A. Plonquet, R.K. Gherardi, and B. Chazaud. 2007. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*. 204:1057-1069.

- Arnold, T., and C. Betsholtz. 2013. The importance of microglia in the development of the vasculature in the central nervous system. *Vascular cell.* 5:4.
- Artlett, C.M. 2012. The Role of the NLRP3 Inflammasome in Fibrosis. *The open rheumatology journal.* 6:80-86.
- Arulkumaran, N., R.J. Unwin, and F.W. Tam. 2011. A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment of inflammatory diseases. *Expert opinion on investigational drugs.* 20:897-915.
- Auffray, C., D. Fogg, M. Garfa, G. Elain, O. Join-Lambert, S. Kayal, S. Sarnacki, A. Cumano, G. Lauvau, and F. Geissmann. 2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science.* 317:666-670.
- Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann. 2009. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology.* 27:669-692.
- Augustin, A.J., and J. Kirchhof. 2009. Inflammation and the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Expert Opin Ther Targets.* 13:641-651.
- Bachelerie, F., A. Ben-Baruch, A.M. Burkhardt, C. Combadiere, J.M. Farber, G.J. Graham, R. Horuk, A.H. Sparre-Ulrich, M. Locati, A.D. Luster, A. Mantovani, K. Matsushima, P.M. Murphy, R. Nibbs, H. Nomiyama, C.A. Power, A.E. Proudfoot, M.M. Rosenkilde, A. Rot, S. Sozzani, M. Thelen, O. Yoshie, and A. Zlotnik. 2014. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacological reviews.* 66:1-79.
- Bacon, K., M. Baggolini, H. Broxmeyer, R. Horuk, I. Lindley, A. Mantovani, K. Matsushima, P. Murphy, H. Nomiyama, J. Oppenheim, A. Rot, T. Schall, M. Tsang, R. Thorpe, J. Van Damme, M. Wadhwa, O. Yoshie, A. Zlotnik, K. Zoon, and I.W.S.o.C. Nomenclature. 2002. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research.* 22:1067-1068.
- Baricordi, O.R., L. Melchiorri, E. Adinolfi, S. Falzoni, P. Chiozzi, G. Buell, and F. Di Virgilio. 1999. Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X(7) ATP receptor. *J Biol Chem.* 274:33206-33208.
- Barna, B.P., J. Pettay, G.H. Barnett, P. Zhou, K. Iwasaki, and M.L. Estes. 1994. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in adult human non-neoplastic astrocytes is sensitive to tumor necrosis factor (TNF) or antibody to the 55-kDa TNF receptor. *J Neuroimmunol.* 50:101-107.
- Bartlett, R., J.J. Yerbury, and R. Sluyter. 2013. P2X7 receptor activation induces reactive oxygen species formation and cell death in murine EOC13 microglia. *Mediators Inflamm.* 2013:271813.
- Basu, A., J.K. Kraday, and S.W. Levison. 2004. Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. *J Neurosci Res.* 78:151-156.
- Basu, A., J.K. Kraday, M. O'Malley, S.D. Styren, S.T. DeKosky, and S.W. Levison. 2002. The type 1 interleukin-1 receptor is essential for the efficient activation of microglia and the induction of multiple proinflammatory mediators in response to brain injury. *J Neurosci.* 22:6071-6082.
- Bauernfeind, F., A. Ablasser, E. Bartok, S. Kim, J. Schmid-Burgk, T. Cavlar, and V. Hornung. 2011. Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cell Mol Life Sci.* 68:765-783.
- Bauernfeind, F.G., G. Horvath, A. Stutz, E.S. Alnemri, K. MacDonald, D. Speert, T. Fernandes-Alnemri, J. Wu, B.G. Monks, K.A. Fitzgerald, V. Hornung, and E. Latz. 2009. Cutting edge: NF- $\kappa$ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol.* 183:787-791.
- Bazan, J.F., K.B. Bacon, G. Hardiman, W. Wang, K. Soo, D. Rossi, D.R. Greaves, A. Zlotnik, and T.J. Schall. 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature.* 385:640-644.

- Beatty, S., H. Koh, M. Phil, D. Henson, and M. Boulton. 2000. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol.* 45:115-134.
- Bernstein, M.H., and M.J. Hollenberg. 1965. Fine structure of the choriocapillaris and retinal capillaries. *Investigative ophthalmology.* 4:1016-1025.
- Bernstein, P.S. 2009. Nutritional Interventions against Age-Related Macular Degeneration. *Acta horticulturae.* 841:103-112.
- Bhutto, I., and G. Lutty. 2012. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Molecular aspects of medicine.* 33:295-317.
- Bilimoria, P.M., and B. Stevens. 2015. Microglia function during brain development: New insights from animal models. *Brain Res.* 1617:7-17.
- Bill, A., P. Tornquist, and A. Alm. 1980. Permeability of the intraocular blood vessels. *Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom.* 100:332-336.
- Black, R.A., S.R. Kronheim, J.E. Merriam, C.J. March, and T.P. Hopp. 1989. A pre-aspartate-specific protease from human leukocytes that cleaves pro-interleukin-1 beta. *J Biol Chem.* 264:5323-5326.
- Block, M.L., and J.S. Hong. 2005. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol.* 76:77-98.
- Boeynaems, J.M., D. Communi, N.S. Gonzalez, and B. Robaye. 2005. Overview of the P2 receptors. *Semin Thromb Hemost.* 31:139-149.
- Boldt, W., M. Klapperstuck, C. Buttner, S. Sadtler, G. Schmalzing, and F. Markwardt. 2003. Glu496Ala polymorphism of human P2X7 receptor does not affect its electrophysiological phenotype. *Am J Physiol Cell Physiol.* 284:C749-756.
- Bond, S.R., and C.C. Naus. 2014. The pannexins: past and present. *Frontiers in physiology.* 5:58.
- Boutin, H., R.A. LeFeuvre, R. Horai, M. Asano, Y. Iwakura, and N.J. Rothwell. 2001. Role of IL-1alpha and IL-1beta in ischemic brain damage. *J Neurosci.* 21:5528-5534.
- Bradford, M.D., and S.P. Soltoff. 2002. P2X7 receptors activate protein kinase D and p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) downstream of protein kinase C. *The Biochemical journal.* 366:745-755.
- Brandle, U., E. Guenther, C. Irrle, and T.H. Wheeler-Schilling. 1998a. Gene expression of the P2X receptors in the rat retina. *Brain research. Molecular brain research.* 59:269-272.
- Brandle, U., K. Kohler, and T.H. Wheeler-Schilling. 1998b. Expression of the P2X7-receptor subunit in neurons of the rat retina. *Brain research. Molecular brain research.* 62:106-109.
- Bressler, S.B., M.G. Maguire, N.M. Bressler, and S.L. Fine. 1990. Relationship of drusen and abnormalities of the retinal pigment epithelium to the prognosis of neovascular macular degeneration. The Macular Photocoagulation Study Group. *Arch Ophthalmol.* 108:1442-1447.
- Bringmann, A., T. Pannicke, J. Grosche, M. Francke, P. Wiedemann, S.N. Skatchkov, N.N. Osborne, and A. Reichenbach. 2006. Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res.* 25:397-424.
- Broderick, C., R.M. Hoek, J.V. Forrester, J. Liversidge, J.D. Sedgwick, and A.D. Dick. 2002. Constitutive retinal CD200 expression regulates resident microglia and activation state of inflammatory cells during experimental autoimmune uveoretinitis. *Am J Pathol.* 161:1669-1677.
- Brown, D.M., P.K. Kaiser, M. Michels, G. Soubrane, J.S. Heier, R.Y. Kim, J.P. Sy, S. Schneider, and A.S. Group. 2006. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 355:1432-1444.
- Broz, P., J. von Moltke, J.W. Jones, R.E. Vance, and D.M. Monack. 2010. Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell host & microbe.* 8:471-483.
- Brunner, T., R.J. Mogil, D. LaFace, N.J. Yoo, A. Mahboubi, F. Echeverri, S.J. Martin, W.R. Force, D.H. Lynch, C.F. Ware, and et al. 1995. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-

- ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature*. 373:441-444.
- Bruzzone, R., M.T. Barbe, N.J. Jakob, and H. Monyer. 2005. Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurochem*. 92:1033-1043.
- Bryan, N.B., A. Dorfleutner, S.J. Kramer, C. Yun, Y. Rojanasakul, and C. Stehlik. 2010. Differential splicing of the apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) regulates inflammasomes. *Journal of inflammation*. 7:23.
- Brydges, S.D., L. Broderick, M.D. McGeough, C.A. Pena, J.L. Mueller, and H.M. Hoffman. 2013. Divergence of IL-1, IL-18, and cell death in NLRP3 inflammasomopathies. *J Clin Invest*. 123:4695-4705.
- Burnstock, G., and G.E. Knight. 2004. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *International review of cytology*. 240:31-304.
- Burnstock, G., G.E. Knight, and A.V. Greig. 2012. Purinergic signaling in healthy and diseased skin. *J Invest Dermatol*. 132:526-546.
- Buschini, E., A. Piras, R. Nuzzi, and A. Vercelli. 2011. Age related macular degeneration and drusen: neuroinflammation in the retina. *Prog Neurobiol*. 95:14-25.
- Cankova, Z., J.D. Huang, H.S. Kruth, and M. Johnson. 2011. Passage of low-density lipoproteins through Bruch's membrane and choroid. *Exp Eye Res*. 93:947-955.
- Cardona, A.E., E.P. Pioro, M.E. Sasse, V. Kostenko, S.M. Cardona, I.M. Dijkstra, D. Huang, G. Kidd, S. Dombrowski, R. Dutta, J.C. Lee, D.N. Cook, S. Jung, S.A. Lira, D.R. Littman, and R.M. Ransohoff. 2006. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci*. 9:917-924.
- Carmo, M.R., A.P. Menezes, A.C. Nunes, A. Pliassova, A.P. Rolo, C.M. Palmeira, R.A. Cunha, P.M. Canas, and G.M. Andrade. 2014. The P2X7 receptor antagonist Brilliant Blue G attenuates contralateral rotations in a rat model of Parkinsonism through a combined control of synaptotoxicity, neurotoxicity and gliosis. *Neuropharmacology*. 81:142-152.
- Carson, M.J., C.R. Reilly, J.G. Sutcliffe, and D. Lo. 1998. Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. *Glia*. 22:72-85.
- Caso, F., L. Costa, D. Rigante, O.M. Lucherini, P. Caso, V. Bascherini, B. Frediani, R. Cimaz, E. Marrani, L. Nieves-Martin, M. Atteno, C.G. Raffaele, G. Tarantino, M. Galeazzi, L. Punzi, and L. Cantarini. 2014. Biological treatments in Behcet's disease: beyond anti-TNF therapy. *Mediators Inflamm*. 2014:107421.
- Chakravarthy, U., and T.A. Gardiner. 1999. Endothelium-derived agents in pericyte function/dysfunction. *Prog Retin Eye Res*. 18:511-527.
- Chakravarthy, U., S.P. Harding, C.A. Rogers, S.M. Downes, A.J. Lotery, L.A. Culliford, B.C. Reeves, and I.s. investigators. 2013. Alternative treatments to inhibit VEGF in age-related choroidal neovascularisation: 2-year findings of the IVAN randomised controlled trial. *Lancet*. 382:1258-1267.
- Charo, I.F., and R.M. Ransohoff. 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*. 354:610-621.
- Chen, C., H. Chen, C. Xu, Y. Zhong, and X. Shen. 2014. Role of interleukin-1beta in hypoxia-induced depression of glutamate uptake in retinal Muller cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 252:51-58.
- Chen, C.J., H. Kono, D. Golenbock, G. Reed, S. Akira, and K.L. Rock. 2007. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med*. 13:851-856.
- Chen, M., J.V. Forrester, and H. Xu. 2011. Dysregulation in retinal para-inflammation and age-related retinal degeneration in CCL2 or CCR2 deficient mice. *PLoS One*. 6:e22818.
- Chinnery, H.R., S. McLenaghan, T. Humphries, J.M. Kezic, X. Chen, M.J. Ruitenberg, and P.G. McMenamin. 2012. Accumulation of murine subretinal macrophages: effects of age, pigmentation and CX(3)CR1. *Neurobiol Aging*.

- Chiu, C.J., R.C. Milton, G. Gensler, and A. Taylor. 2007. Association between dietary glycemic index and age-related macular degeneration in nondiabetic participants in the Age-Related Eye Disease Study. *Am J Clin Nutr.* 86:180-188.
- Chu, K., B. Yin, J. Wang, G. Peng, H. Liang, Z. Xu, Y. Du, M. Fang, Q. Xia, and B. Luo. 2012. Inhibition of P2X7 receptor ameliorates transient global cerebral ischemia/reperfusion injury via modulating inflammatory responses in the rat hippocampus. *J Neuroinflammation.* 9:69.
- Chuluundorj, D., S.A. Harding, D. Abernethy, and A.C. La Flamme. 2014. Expansion and preferential activation of the CD14(+)CD16(+) monocyte subset during multiple sclerosis. *Immunology and cell biology.* 92:509-517.
- Clark, A.K., P.K. Yip, and M. Malcangio. 2009. The liberation of fractalkine in the dorsal horn requires microglial cathepsin S. *J Neurosci.* 29:6945-6954.
- Coleman, H.R., C.C. Chan, F.L. Ferris, 3rd, and E.Y. Chew. 2008. Age-related macular degeneration. *Lancet.* 372:1835-1845.
- Combadiere, C., C. Feumi, W. Raoul, N. Keller, M. Rodero, A. Pezard, S. Lavalette, M. Houssier, L. Jonet, E. Picard, P. Debre, M. Sirinyan, P. Deterre, T. Ferroukhi, S.Y. Cohen, D. Chauvaud, J.C. Jeanny, S. Chemtob, F. Behar-Cohen, and F. Sennlaub. 2007. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J Clin Invest.* 117:2920-2928.
- Combadiere, C., S. Potteaux, J.L. Gao, B. Esposito, S. Casanova, E.J. Lee, P. Debre, A. Tedgui, P.M. Murphy, and Z. Mallat. 2003. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation.* 107:1009-1016.
- Conductier, G., N. Blondeau, A. Guyon, J.L. Nahon, and C. Rovere. 2010. The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. *J Neuroimmunol.* 224:93-100.
- Connor, R.I., L. Shen, and M.W. Fanger. 1990. Evaluation of the antibody-dependent cytotoxic capabilities of individual human monocytes. Role of Fc gamma RI and Fc gamma RII and the effects of cytokines at the single cell level. *J Immunol.* 145:1483-1489.
- Crofton, R.W., M.M. Diesselhoff-den Dulk, and R. van Furth. 1978. The origin, kinetics, and characteristics of the Kupffer cells in the normal steady state. *J Exp Med.* 148:1-17.
- Cros, J., N. Cagnard, K. Woppard, N. Patey, S.Y. Zhang, B. Senechal, A. Puel, S.K. Biswas, D. Moshous, C. Picard, J.P. Jais, D. D'Cruz, J.L. Casanova, C. Trouillet, and F. Geissmann. 2010. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity.* 33:375-386.
- Cruickshanks, K.J., R. Klein, B.E. Klein, and D.M. Nondahl. 2001. Sunlight and the 5-year incidence of early age-related maculopathy: the beaver dam eye study. *Arch Ophthalmol.* 119:246-250.
- Cruz, C.M., A. Rinna, H.J. Forman, A.L. Ventura, P.M. Persechini, and D.M. Ojcius. 2007. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem.* 282:2871-2879.
- Cruz-Guilloty, F., A.M. Saeed, J.J. Echegaray, S. Duffort, A. Ballmick, Y. Tan, M. Betancourt, E. Viteri, G.C. Ramkhellawan, E. Ewald, W. Feuer, D. Huang, R. Wen, L. Hong, H. Wang, J.M. Laird, A. Sene, R.S. Apte, R.G. Salomon, J.G. Hollyfield, and V.L. Perez. 2013. Infiltration of proinflammatory m1 macrophages into the outer retina precedes damage in a mouse model of age-related macular degeneration. *International journal of inflammation.* 2013:503725.
- Curcio, C.A., N.E. Medeiros, and C.L. Millican. 1996. Photoreceptor loss in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37:1236-1249.
- Cushing, S.D., J.A. Berliner, A.J. Valente, M.C. Territo, M. Navab, F. Parhami, R. Gerrity, C.J. Schwartz, and A.M. Fogelman. 1990. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:5134-5138.

- Dahl, G. 2007. Gap junction-mimetic peptides do work, but in unexpected ways. *Cell Commun Adhes.* 14:259-264.
- Damani, M.R., L. Zhao, A.M. Fontainhas, J. Amaral, R.N. Fariss, and W.T. Wong. 2011. Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia. *Aging Cell.* 10:263-276.
- Davalos, D., J. Grutzendler, G. Yang, J.V. Kim, Y. Zuo, S. Jung, D.R. Littman, M.L. Dustin, and W.B. Gan. 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 8:752-758.
- Davies, C.A., S.A. Loddick, S. Toulmond, R.P. Stroemer, J. Hunt, and N.J. Rothwell. 1999. The progression and topographic distribution of interleukin-1beta expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 19:87-98.
- De Berardinis, E., O. Tieri, A. Polzella, and N. Iuglio. 1965. The chemical composition of the human aqueous humour in normal and pathological conditions. *Exp Eye Res.* 4:179-186.
- de Haas, A.H., H.R. van Weering, E.K. de Jong, H.W. Boddeke, and K.P. Biber. 2007. Neuronal chemokines: versatile messengers in central nervous system cell interaction. *Molecular neurobiology.* 36:137-151.
- Delcourt, C., J.L. Diaz, A. Ponton-Sanchez, and L. Papoz. 1998. Smoking and age-related macular degeneration. The POLA Study. Pathologies Oculaires Liees a l'Age. *Arch Ophthalmol.* 116:1031-1035.
- Devi, T.S., I. Lee, M. Hutmenn, A. Kumar, K.D. Nantwi, and L.P. Singh. 2012. TXNIP links innate host defense mechanisms to oxidative stress and inflammation in retinal Muller glia under chronic hyperglycemia: implications for diabetic retinopathy. *Experimental diabetes research.* 2012:438238.
- Dewan, A., M. Liu, S. Hartman, S.S. Zhang, D.T. Liu, C. Zhao, P.O. Tam, W.M. Chan, D.S. Lam, M. Snyder, C. Barnstable, C.P. Pang, and J. Hoh. 2006. HTA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science.* 314:989-992.
- Di Virgilio, F. 2013. The therapeutic potential of modifying inflammasomes and NOD-like receptors. *Pharmacological reviews.* 65:872-905.
- Diaz-Hernandez, M., M. Diez-Zaera, J. Sanchez-Nogueiro, R. Gomez-Villafuertes, J.M. Canals, J. Alberch, M.T. Miras-Portugal, and J.J. Lucas. 2009. Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. *FASEB J.* 23:1893-1906.
- Dinarello, C.A. 2002. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol.* 20:S1-13.
- Dinarello, C.A. 2005. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med.* 201:1355-1359.
- Dinarello, C.A. 2007. A signal for the caspase-1 inflammasome free of TLR. *Immunity.* 26:383-385.
- Dinarello, C.A. 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual review of immunology.* 27:519-550.
- Dinarello, C.A. 2010. IL-1: discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol.* 40:599-606.
- dos Santos, G., M.A. Kutuzov, and K.M. Ridge. 2012. The inflammasome in lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 303:L627-633.
- Dostert, C., V. Petrilli, R. Van Bruggen, C. Steele, B.T. Mossman, and J. Tschopp. 2008. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science.* 320:674-677.
- Doyle, S.L., M. Campbell, E. Ozaki, R.G. Salomon, A. Mori, P.F. Kenna, G.J. Farrar, A.S. Kiang, M.M. Humphries, E.C. Lavelle, L.A. O'Neill, J.G. Hollyfield, and P. Humphries. 2012. NLRP3 has a protective role in age-related macular degeneration through the induction of IL-18 by drusen components. *Nat Med.* 18:791-798.
- Durham, D.G. 1970. Distribution of free amino acids in human intraocular fluids. *Transactions of the American Ophthalmological Society.* 68:462-500.
- Eder, C. 2009. Mechanisms of interleukin-1beta release. *Immunobiology.* 214:543-553.

- Edwards, A.O., R. Ritter, 3rd, K.J. Abel, A. Manning, C. Panhuysen, and L.A. Farrer. 2005. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science*. 308:421-424.
- Eisenberg, S.P., R.J. Evans, W.P. Arend, E. Verderber, M.T. Brewer, C.H. Hannum, and R.C. Thompson. 1990. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature*. 343:341-346.
- El Khoury, J., M. Toft, S.E. Hickman, T.K. Means, K. Terada, C. Geula, and A.D. Luster. 2007. Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med*. 13:432-438.
- Eriksson, C., A.M. Van Dam, P.J. Lucassen, J.G. Bol, B. Winblad, and M. Schultzberg. 1999. Immunohistochemical localization of interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1beta converting enzyme/caspase-1 in the rat brain after peripheral administration of kainic acid. *Neuroscience*. 93:915-930.
- Ersoy, L., T. Ristau, Y.T. Lechanteur, M. Hahn, C.B. Hoyng, B. Kirchhof, A.I. den Hollander, and S. Fauser. 2014. Nutritional risk factors for age-related macular degeneration. *BioMed research international*. 2014:413150.
- Fadok, V.A., D.L. Bratton, A. Konowal, P.W. Freed, J.Y. Westcott, and P.M. Henson. 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*. 101:890-898.
- Fantin, A., J.M. Vieira, G. Gestri, L. Denti, Q. Schwarz, S. Prykhozhij, F. Peri, S.W. Wilson, and C. Ruhrberg. 2010. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood*. 116:829-840.
- Feng, X., F. Szulzewsky, A. Yerevanian, Z. Chen, D. Heinzmann, R.D. Rasmussen, V. Alvarez-Garcia, Y. Kim, B. Wang, I. Tamagno, H. Zhou, X. Li, H. Kettenmann, R.M. Ransohoff, and D. Hambardzumyan. 2015. Loss of CX3CR1 increases accumulation of inflammatory monocytes and promotes gliomagenesis. *Oncotarget*. 6:15077-15094.
- Feng, Y.H., X. Li, L. Wang, L. Zhou, and G.I. Gorodeski. 2006. A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization. *J Biol Chem*. 281:17228-17237.
- Ferrara, N. 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews*. 25:581-611.
- Ferrari, D., P. Chiozzi, S. Falzoni, M. Dal Susino, L. Melchiorri, O.R. Baricordi, and F. Di Virgilio. 1997. Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol*. 159:1451-1458.
- Ferrari, D., C. Pizzirani, E. Adinolfi, R.M. Lemoli, A. Curti, M. Idzko, E. Panther, and F. Di Virgilio. 2006. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol*. 176:3877-3883.
- Fife, B.T., G.B. Huffnagle, W.A. Kuziel, and W.J. Karpus. 2000. CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 192:899-905.
- Fontaine, V., S. Mohand-Said, N. Hanoteau, C. Fuchs, K. Pfizenmaier, and U. Eisel. 2002. Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *J Neurosci*. 22:RC216.
- Forrester, J.V. (2002). *The Eye: Basic Sciences in Practice* (WB. Saunders)
- Forrester, J.V., H. Xu, L. Kuffova, A.D. Dick, and P.G. McMenamin. 2010. Dendritic cell physiology and function in the eye. *Immunol Rev*. 234:282-304.
- Frei, K., C. Siepl, P. Groscurth, S. Bodmer, C. Schwerdel, and A. Fontana. 1987. Antigen presentation and tumor cytotoxicity by interferon-gamma-treated microglial cells. *Eur J Immunol*. 17:1271-1278.

- Friedman, D.S., B.J. O'Colmain, B. Munoz, S.C. Tomany, C. McCarty, P.T. de Jong, B. Nemesure, P. Mitchell, J. Kempen, and G. Eye Diseases Prevalence Research. 2004. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol.* 122:564-572.
- Fritzsche, L.G., T. Loenhardt, A. Janssen, S.A. Fisher, A. Rivera, C.N. Keilhauer, and B.H. Weber. 2008. Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA. *Nat Genet.* 40:892-896.
- Fuhrmann, M., T. Bittner, C.K. Jung, S. Burgold, R.M. Page, G. Mitteregger, C. Haass, F.M. LaFerla, H. Kretzschmar, and J. Herms. 2010. Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* 13:411-413.
- Garlanda, C., C.A. Dinarello, and A. Mantovani. 2013. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity.* 39:1003-1018.
- Garton, K.J., P.J. Gough, C.P. Blobel, G. Murphy, D.R. Greaves, P.J. Dempsey, and E.W. Raines. 2001. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem.* 276:37993-38001.
- Geissmann, F., S. Gordon, D.A. Hume, A.M. Mowat, and G.J. Randolph. 2010. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nature reviews. Immunology.* 10:453-460.
- Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 19:71-82.
- Ginhoux, F., M. Greter, M. Leboeuf, S. Nandi, P. See, S. Gokhan, M.F. Mehler, S.J. Conway, L.G. Ng, E.R. Stanley, I.M. Samokhvalov, and M. Merad. 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science.* 330:841-845.
- Girmens, J.F., J.A. Sahel, and K. Marazova. 2012. Dry age-related macular degeneration: A currently unmet clinical need. *Intractable & rare diseases research.* 1:103-114.
- Gopal, R., D. Birdsell, and F.P. Monroy. 2011. Regulation of chemokine responses in intestinal epithelial cells by stress and Toxoplasma gondii infection. *Parasite immunology.* 33:12-24.
- Gordon, S. 2007. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol.* 37 Suppl 1:S9-17.
- Gordon, S., and P.R. Taylor. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews. Immunology.* 5:953-964.
- Goslings, W.R., A.P. Prodeus, J.W. Streilein, M.C. Carroll, M.J. Jager, and A.W. Taylor. 1998. A small molecular weight factor in aqueous humor acts on C1q to prevent antibody-dependent complement activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39:989-995.
- Greaves, D.R., and S. Gordon. 2001. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *Trends in immunology.* 22:180-181.
- Greig, A.V., C. Linge, A. Cambrey, and G. Burnstock. 2003. Purinergic receptors are part of a signaling system for keratinocyte proliferation, differentiation, and apoptosis in human fetal epidermis. *J Invest Dermatol.* 121:1145-1149.
- Grossniklaus, H.E., J.X. Ling, T.M. Wallace, S. Dithmar, D.H. Lawson, C. Cohen, V.M. Elner, S.G. Elner, and P. Sternberg, Jr. 2002. Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. *Mol Vis.* 8:119-126.
- Grozdanov, V., C. Bliederhaeuser, W.P. Ruf, V. Roth, K. Fundel-Clemens, L. Zondler, D. Brenner, A. Martin-Villalba, B. Hengerer, J. Kassubek, A.C. Ludolph, J.H. Weishaupt, and K.M. Danzer. 2014. Inflammatory dysregulation of blood monocytes in Parkinson's disease patients. *Acta neuropathologica.* 128:651-663.
- Gu, B.J., W. Zhang, R.A. Worthington, R. Sluyter, P. Dao-Ung, S. Petrou, J.A. Barden, and J.S. Wiley. 2001. A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem.* 276:11135-11142.
- Guarda, G., M. Zenger, A.S. Yazdi, K. Schroder, I. Ferrero, P. Menu, A. Tardivel, C. Mattmann, and J. Tschopp. 2011. Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *J Immunol.* 186:2529-2534.

- Guo, C., A. Otani, A. Oishi, H. Kojima, Y. Makiyama, S. Nakagawa, and N. Yoshimura. 2012. Knockout of ccr2 alleviates photoreceptor cell death in a model of retinitis pigmentosa. *Exp Eye Res.* 104:39-47.
- Gupta, N., K.E. Brown, and A.H. Milam. 2003. Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res.* 76:463-471.
- Haddad, S., C.A. Chen, S.L. Santangelo, and J.M. Seddon. 2006. The genetics of age-related macular degeneration: a review of progress to date. *Surv Ophthalmol.* 51:316-363.
- Hageman, G.S., D.H. Anderson, L.V. Johnson, L.S. Hancox, A.J. Taiber, L.I. Hardisty, J.L. Hageman, H.A. Stockman, J.D. Borchardt, K.M. Gehrs, R.J. Smith, G. Silvestri, S.R. Russell, C.C. Klaver, I. Barbazetto, S. Chang, L.A. Yannuzzi, G.R. Barile, J.C. Merriam, R.T. Smith, A.K. Olsh, J. Bergeron, J. Zernant, J.E. Merriam, B. Gold, M. Dean, and R. Allikmets. 2005. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:7227-7232.
- Hageman, G.S., P.J. Luthert, N.H. Victor Chong, L.V. Johnson, D.H. Anderson, and R.F. Mullins. 2001. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 20:705-732.
- Haines, J.L., M.A. Hauser, S. Schmidt, W.K. Scott, L.M. Olson, P. Gallins, K.L. Spencer, S.Y. Kwan, M. Noureddine, J.R. Gilbert, N. Schnetz-Boutaud, A. Agarwal, E.A. Postel, and M.A. Pericak-Vance. 2005. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science.* 308:419-421.
- Halle, A., V. Hornung, G.C. Petzold, C.R. Stewart, B.G. Monks, T. Reinheckel, K.A. Fitzgerald, E. Latz, K.J. Moore, and D.T. Golenbock. 2008. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol.* 9:857-865.
- Hanley, P.J., M. Kronlage, C. Kirschning, A. del Rey, F. Di Virgilio, J. Leipziger, I.P. Chessell, S. Sargin, M.A. Filippov, O. Lindemann, S. Mohr, V. Konigs, H. Schillers, M. Bahler, and A. Schwab. 2012. Transient P2X7 receptor activation triggers macrophage death independent of Toll-like receptors 2 and 4, caspase-1, and pannexin-1 proteins. *J Biol Chem.* 287:10650-10663.
- Harrison, J.K., C.M. Barber, and K.R. Lynch. 1994. cDNA cloning of a G-protein-coupled receptor expressed in rat spinal cord and brain related to chemokine receptors. *Neurosci Lett.* 169:85-89.
- Harrison, J.K., Y. Jiang, S. Chen, Y. Xia, D. Maciejewski, R.K. McNamara, W.J. Streit, M.N. Salafranca, S. Adhikari, D.A. Thompson, P. Botti, K.B. Bacon, and L. Feng. 1998. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:10896-10901.
- Heidemann, J., H. Ogawa, M.B. Dwinell, P. Rafiee, C. Maaser, H.R. Gockel, M.F. Otterson, D.M. Ota, N. Lugering, W. Domschke, and D.G. Binion. 2003. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem.* 278:8508-8515.
- Heier, J.S., D.M. Brown, V. Chong, J.F. Korobelnik, P.K. Kaiser, Q.D. Nguyen, B. Kirchhof, A. Ho, Y. Ogura, G.D. Yancopoulos, N. Stahl, R. Vitti, A.J. Berliner, Y. Soo, M. Anderesi, G. Groetzbach, B. Sommerauer, R. Sandbrink, C. Simader, U. Schmidt-Erfurth, View, and V.S. Groups. 2012. Intravitreal afibbercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 119:2537-2548.
- Hetier, E., J. Ayala, P. Denefle, A. Bousseau, P. Rouget, M. Mallat, and A. Prochiantz. 1988. Brain macrophages synthesize interleukin-1 and interleukin-1 mRNAs in vitro. *J Neurosci Res.* 21:391-397.
- Hickey, W.F., and H. Kimura. 1988. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science.* 239:290-292.

- Hinojosa, A.E., B. Garcia-Bueno, J.C. Leza, and J.L. Madrigal. 2011. CCL2/MCP-1 modulation of microglial activation and proliferation. *J Neuroinflammation*. 8:77.
- Hodge, W.G., H.M. Schachter, D. Barnes, Y. Pan, E.C. Lowcock, L. Zhang, M. Sampson, A. Morrison, K. Tran, M. Miguelez, and G. Lewin. 2006. Efficacy of omega-3 fatty acids in preventing age-related macular degeneration: a systematic review. *Ophthalmology*. 113:1165-1172; quiz 1172-1163, 1178.
- Hoffman, H.M., J.L. Mueller, D.H. Broide, A.A. Wanderer, and R.D. Kolodner. 2001. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet*. 29:301-305.
- Hollyfield, J.G., V.L. Perez, and R.G. Salomon. 2010. A hapten generated from an oxidation fragment of docosahexaenoic acid is sufficient to initiate age-related macular degeneration. *Molecular neurobiology*. 41:290-298.
- Holz, F.G., A. Bindewald-Wittich, M. Fleckenstein, J. Dreyhaupt, H.P. Scholl, S. Schmitz-Valckenberg, and F.A.-S. Group. 2007. Progression of geographic atrophy and impact of fundus autofluorescence patterns in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 143:463-472.
- Honore, P., D. Donnelly-Roberts, M.T. Namovic, G. Hsieh, C.Z. Zhu, J.P. Mikusa, G. Hernandez, C. Zhong, D.M. Gauvin, P. Chandran, R. Harris, A.P. Medrano, W. Carroll, K. Marsh, J.P. Sullivan, C.R. Faltynek, and M.F. Jarvis. 2006. A-740003 [N-(1-{{(cyanoimino)(5-quinolinylamino)methyl}amino}-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 319:1376-1385.
- Hornung, V., F. Bauernfeind, A. Halle, E.O. Samstad, H. Kono, K.L. Rock, K.A. Fitzgerald, and E. Latz. 2008. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*. 9:847-856.
- Hsu, H.Y., and M.H. Wen. 2002. Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression. *J Biol Chem*. 277:22131-22139.
- Huang, D.R., J. Wang, P. Kivisakk, B.J. Rollins, and R.M. Ransohoff. 2001. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 193:713-726.
- Huang, Y.W., P. Su, G.Y. Liu, M.R. Crow, D. Chaukos, H. Yan, and L.A. Robinson. 2009. Constitutive endocytosis of the chemokine CX3CL1 prevents its degradation by cell surface metalloproteases. *J Biol Chem*. 284:29644-29653.
- Hume, D.A. 2006. The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol*. 18:49-53.
- Hundhausen, C., D. Misztela, T.A. Berkhouit, N. Broadway, P. Saftig, K. Reiss, D. Hartmann, F. Fahrenholz, R. Postina, V. Matthews, K.J. Kallen, S. Rose-John, and A. Ludwig. 2003. The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood*. 102:1186-1195.
- Iglesias, R., S. Locovei, A. Roque, A.P. Alberto, G. Dahl, D.C. Spray, and E. Scemes. 2008. P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*. 295:C752-760.
- Ikeda, U., K. Matsui, Y. Murakami, and K. Shimada. 2002. Monocyte chemoattractant protein-1 and coronary artery disease. *Clin Cardiol*. 25:143-147.
- Imai, T., K. Hieshima, C. Haskell, M. Baba, M. Nagira, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi, H. Nomiyama, T.J. Schall, and O. Yoshie. 1997. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell*. 91:521-530.
- Imaizumi, T., H. Yoshida, and K. Satoh. 2004. Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 11:15-21.
- Inoue, K. 2002. Microglial activation by purines and pyrimidines. *Glia*. 40:156-163.

- Ishikawa, M. 2013. Abnormalities in glutamate metabolism and excitotoxicity in the retinal diseases. *Scientifica*. 2013:528940.
- Jacobson, K.A., and J.M. Boeynaems. 2010. P2Y nucleotide receptors: promise of therapeutic applications. *Drug Discov Today*. 15:570-578.
- Jakobsdottir, J., Y.P. Conley, D.E. Weeks, T.S. Mah, R.E. Ferrell, and M.B. Gorin. 2005. Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26. *Am J Hum Genet*. 77:389-407.
- Jarrett, S.G., and M.E. Boulton. 2012. Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Molecular aspects of medicine*. 33:399-417.
- Jarvis, M.F., and B.S. Khakh. 2009. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology*. 56:208-215.
- Javitt, J.C., F. Wang, and S.K. West. 1996. Blindness due to cataract: epidemiology and prevention. *Annual review of public health*. 17:159-177.
- Jenkins, S.J., D. Ruckerl, P.C. Cook, L.H. Jones, F.D. Finkelman, N. van Rooijen, A.S. MacDonald, and J.E. Allen. 2011. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science*. 332:1284-1288.
- Jiang, L.H. 2009. Inhibition of P2X(7) receptors by divalent cations: old action and new insight. *Eur Biophys J*. 38:339-346.
- Johnson, L.V., W.P. Leitner, M.K. Staples, and D.H. Anderson. 2001. Complement activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration. *Exp Eye Res*. 73:887-896.
- Johnson, L.V., S. Ozaki, M.K. Staples, P.A. Erickson, and D.H. Anderson. 2000. A potential role for immune complex pathogenesis in drusen formation. *Exp Eye Res*. 70:441-449.
- Jonas, J.B., U. Schneider, and G.O. Naumann. 1992. Count and density of human retinal photoreceptors. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 230:505-510.
- Juliana, C., T. Fernandes-Alnemri, S. Kang, A. Farias, F. Qin, and E.S. Alnemri. 2012. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem*. 287:36617-36622.
- Jung, S., J. Aliberti, P. Graemmel, M.J. Sunshine, G.W. Kreutzberg, A. Sher, and D.R. Littman. 2000. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol*. 20:4106-4114.
- Junger, W.G. 2011. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nature reviews. Immunology*. 11:201-212.
- Kahlenberg, J.M., and G.R. Dubyak. 2004. Differing caspase-1 activation states in monocyte versus macrophage models of IL-1beta processing and release. *J Leukoc Biol*. 76:676-684.
- Kaneko, H., K.M. Nishiguchi, M. Nakamura, S. Kachi, and H. Terasaki. 2008. Characteristics of bone marrow-derived microglia in the normal and injured retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 49:4162-4168.
- Kanneganti, T.D., M. Lamkanfi, Y.G. Kim, G. Chen, J.H. Park, L. Franchi, P. Vandenabeele, and G. Nunez. 2007. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity*. 26:433-443.
- Karlstetter, M., R. Scholz, M. Rutar, W.T. Wong, J.M. Provis, and T. Langmann. 2015. Retinal microglia: just bystander or target for therapy? *Prog Retin Eye Res*. 45:30-57.
- Kawa, M.P., A. Machalinska, D. Roginska, and B. Machalinski. 2014. Complement system in pathogenesis of AMD: dual player in degeneration and protection of retinal tissue. *Journal of immunology research*. 2014:483960.
- Kawano, A., M. Tsukimoto, T. Noguchi, N. Hotta, H. Harada, T. Takenouchi, H. Kitani, and S. Kojima. 2012. Involvement of P2X4 receptor in P2X7 receptor-dependent cell death of mouse macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 419:374-380.

- Kerur, N., Y. Hirano, V. Tarallo, B.J. Fowler, A. Bastos-Carvalho, T. Yasuma, R. Yasuma, Y. Kim, D.R. Hinton, C.J. Kirschning, B.D. Gelfand, and J. Ambati. 2013. TLR-independent and P2X7-dependent signaling mediate Alu RNA-induced NLRP3 inflammasome activation in geographic atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54:7395-7401.
- Kettenmann, H., F. Kirchhoff, and A. Verkhratsky. 2013. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron.* 77:10-18.
- Kevany, B.M., and K. Palczewski. 2010. Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors. *Physiology.* 25:8-15.
- Kezic, J.M., X. Chen, E.P. Rakoczy, and P.G. McMenamin. 2013. The effects of age and Cx3cr1 deficiency on retinal microglia in the Ins2(Akita) diabetic mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54:854-863.
- Khakh, B.S. 2001. Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat Rev Neurosci.* 2:165-174.
- Khan, J.C., H. Shahid, D.A. Thurlby, M. Bradley, D.G. Clayton, A.T. Moore, A.C. Bird, J.R. Yates, and A.M.D.S. Genetic Factors in. 2006a. Age related macular degeneration and sun exposure, iris colour, and skin sensitivity to sunlight. *Br J Ophthalmol.* 90:29-32.
- Khan, J.C., D.A. Thurlby, H. Shahid, D.G. Clayton, J.R. Yates, M. Bradley, A.T. Moore, A.C. Bird, and A.M.D.S. Genetic Factors in. 2006b. Smoking and age related macular degeneration: the number of pack years of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation. *Br J Ophthalmol.* 90:75-80.
- Kierdorf, K., D. Erny, T. Goldmann, V. Sander, C. Schulz, E.G. Perdigero, P. Wieghofer, A. Heinrich, P. Riemke, C. Holscher, D.N. Muller, B. Luckow, T. Brocker, K. Debowski, G. Fritz, G. Opdenakker, A. Diefenbach, K. Biber, M. Heikenwalder, F. Geissmann, F. Rosenbauer, and M. Prinz. 2013. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci.* 16:273-280.
- Kim, M., L.H. Jiang, H.L. Wilson, R.A. North, and A. Surprenant. 2001. Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J.* 20:6347-6358.
- Kimelberg, H.K. 2010. Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry.* 16:79-106.
- Kimelberg, H.K., and M. Nedergaard. 2010. Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics.* 7:338-353.
- Kingsbury, S.R., P.G. Conaghan, and M.F. McDermott. 2011. The role of the NLRP3 inflammasome in gout. *Journal of inflammation research.* 4:39-49.
- Klaver, C.C., R.C. Wolfs, J.J. Assink, C.M. van Duijn, A. Hofman, and P.T. de Jong. 1998. Genetic risk of age-related maculopathy. Population-based familial aggregation study. *Arch Ophthalmol.* 116:1646-1651.
- Klein, R., M.D. Davis, Y.L. Magli, P. Segal, B.E. Klein, and L. Hubbard. 1991. The Wisconsin age-related maculopathy grading system. *Ophthalmology.* 98:1128-1134.
- Klein, R., B.E. Klein, and K.J. Cruickshanks. 1999. The prevalence of age-related maculopathy by geographic region and ethnicity. *Prog Retin Eye Res.* 18:371-389.
- Klein, R., B.E. Klein, S.C. Jensen, and S.M. Meuer. 1997. The five-year incidence and progression of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology.* 104:7-21.
- Klein, R., B.E. Klein, M.D. Knudtson, S.M. Meuer, M. Swift, and R.E. Gangnon. 2007. Fifteen-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology.* 114:253-262.
- Klein, R., B.E. Klein, M.D. Knudtson, T.Y. Wong, M.F. Cotch, K. Liu, G. Burke, M.F. Saad, and D.R. Jacobs, Jr. 2006. Prevalence of age-related macular degeneration in 4 racial/ethnic groups in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Ophthalmology.* 113:373-380.

- Klein, R., B.E. Klein, K.L. Linton, and D.L. DeMets. 1993. The Beaver Dam Eye Study: the relation of age-related maculopathy to smoking. *Am J Epidemiol.* 137:190-200.
- Klein, R., B.E. Klein, S.C. Tomany, S.M. Meuer, and G.H. Huang. 2002. Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: The Beaver Dam eye study. *Ophthalmology.* 109:1767-1779.
- Klein, R., M.D. Knudtson, B.E. Klein, T.Y. Wong, M.F. Cotch, K. Liu, C.Y. Cheng, G.L. Burke, M.F. Saad, D.R. Jacobs, Jr., and A.R. Sharrett. 2008. Inflammation, complement factor h, and age-related macular degeneration: the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis. *Ophthalmology.* 115:1742-1749.
- Klein, R.J., C. Zeiss, E.Y. Chew, J.Y. Tsai, R.S. Sackler, C. Haynes, A.K. Henning, J.P. SanGiovanni, S.M. Mane, S.T. Mayne, M.B. Bracken, F.L. Ferris, J. Ott, C. Barnstable, and J. Hoh. 2005. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science.* 308:385-389.
- Kobayashi, Y., K. Yamamoto, T. Saido, H. Kawasaki, J.J. Oppenheim, and K. Matsushima. 1990. Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:5548-5552.
- Kohno, H., Y. Chen, B.M. Kevany, E. Pearlman, M. Miyagi, T. Maeda, K. Palczewski, and A. Maeda. 2013. Photoreceptor Proteins Initiate Microglial Activation via Toll-like Receptor 4 in Retinal Degeneration Mediated by All-trans-retinal. *J Biol Chem.* 288:15326-15341.
- Kolb, H. 1995. Glial Cells of the Retina. In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System.* H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson, editors, Salt Lake City (UT).
- Kriegel, M.A., M.O. Li, S. Sanjabi, Y.Y. Wan, and R.A. Flavell. 2006. Transforming growth factor-beta: recent advances on its role in immune tolerance. *Current rheumatology reports.* 8:138-144.
- Ladeby, R., M. Wirenfeldt, D. Garcia-Ovejero, C. Fenger, L. Dissing-Olesen, I. Dalmau, and B. Finsen. 2005. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain research. Brain research reviews.* 48:196-206.
- Lamkanfi, M., J.L. Mueller, A.C. Vitari, S. Misaghi, A. Fedorova, K. Deshayes, W.P. Lee, H.M. Hoffman, and V.M. Dixit. 2009. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J Cell Biol.* 187:61-70.
- Landsman, L., L. Bar-On, A. Zernecke, K.W. Kim, R. Krauthgamer, E. Shagdarsuren, S.A. Lira, I.L. Weissman, C. Weber, and S. Jung. 2009. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood.* 113:963-972.
- Langmann, T. 2007. Microglia activation in retinal degeneration. *J Leukoc Biol.* 81:1345-1351.
- Latkovskis, G., N. Licis, and U. Kalnins. 2004. C-reactive protein levels and common polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster and interleukin-6 gene in patients with coronary heart disease. *European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics.* 31:207-213.
- Lavalette, S., W. Raoul, M. Houssier, S. Camelo, O. Levy, B. Calippe, L. Jonet, F. Behar-Cohen, S. Chemtob, X. Guillonneau, C. Combadiere, and F. Sennlaub. 2011. Interleukin-1beta inhibition prevents choroidal neovascularization and does not exacerbate photoreceptor degeneration. *Am J Pathol.* 178:2416-2423.
- Lawrence, T., D.A. Willoughby, and D.W. Gilroy. 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature reviews. Immunology.* 2:787-795.
- Lazarowski, E.R., R.C. Boucher, and T.K. Harden. 2003. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol.* 64:785-795.
- Lee, G.S., N. Subramanian, A.I. Kim, I. Aksentijevich, R. Goldbach-Mansky, D.B. Sacks, R.N. Germain, D.L. Kastner, and J.J. Chae. 2012. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca<sup>2+</sup> and cAMP. *Nature.* 492:123-127.
- Lee, S., N.H. Varvel, M.E. Konerth, G. Xu, A.E. Cardona, R.M. Ransohoff, and B.T. Lamb. 2010. CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models. *Am J Pathol.* 177:2549-2562.

- Lenertz, L.Y., M.L. Gavala, L.M. Hill, and P.J. Bertics. 2009. Cell signaling via the P2X(7) nucleotide receptor: linkage to ROS production, gene transcription, and receptor trafficking. *Purinergic signalling*. 5:175-187.
- Lenertz, L.Y., M.L. Gavala, Y. Zhu, and P.J. Bertics. 2011. Transcriptional control mechanisms associated with the nucleotide receptor P2X7, a critical regulator of immunologic, osteogenic, and neurologic functions. *Immunologic research*. 50:22-38.
- Lesnik, P., C.A. Haskell, and I.F. Charo. 2003. Decreased atherosclerosis in CX3CR1<sup>-/-</sup> mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest*. 111:333-340.
- Leveillard, T., S. Mohand-Said, O. Lorentz, D. Hicks, A.C. Fintz, E. Clerin, M. Simonutti, V. Forster, N. Cavusoglu, F. Chalmel, P. Dolle, O. Poch, G. Lambrou, and J.A. Sahel. 2004. Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. *Nat Genet*. 36:755-759.
- Levesque, S.A., F. Kukulski, K. Enjyoji, S.C. Robson, and J. Sevigny. 2010. NTPDase1 governs P2X7-dependent functions in murine macrophages. *Eur J Immunol*. 40:1473-1485.
- Levy, O., B. Calippe, S. Lavalette, S.J. Hu, W. Raoul, E. Dominguez, M. Housset, M. Paques, J.A. Sahel, A.P. Bemelmans, C. Combadiere, X. Guillonneau, and F. Sennlaub. 2015. Apolipoprotein E promotes subretinal mononuclear phagocyte survival and chronic inflammation in age-related macular degeneration. *EMBO Mol Med*. 7:211-226.
- Li, H., A. Ambade, and F. Re. 2009. Cutting edge: Necrosis activates the NLRP3 inflammasome. *J Immunol*. 183:1528-1532.
- Li, L., N. Eter, and P. Heiduschka. 2015. The microglia in healthy and diseased retina. *Exp Eye Res*. 136:116-130.
- Li, M.O., Y.Y. Wan, S. Sanjabi, A.K. Robertson, and R.A. Flavell. 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual review of immunology*. 24:99-146.
- Lin, H.W., A. Basu, C. Druckman, M. Cicchese, J.K. Kradl, and S.W. Levison. 2006. Astrogliosis is delayed in type 1 interleukin-1 receptor-null mice following a penetrating brain injury. *J Neuroinflammation*. 3:15.
- Lindia, J.A., E. McGowan, N. Jochnowitz, and C. Abbadie. 2005. Induction of CX3CL1 expression in astrocytes and CX3CR1 in microglia in the spinal cord of a rat model of neuropathic pain. *J Pain*. 6:434-438.
- Ling, E.A., and W.C. Wong. 1993. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia*. 7:9-18.
- Lister, M.F., J. Sharkey, D.A. Sawatzky, J.P. Hodgkiss, D.J. Davidson, A.G. Rossi, and K. Finlayson. 2007. The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation. *Journal of inflammation*. 4:5.
- Liu, K., and M.C. Nussenzweig. 2010. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev*. 234:45-54.
- Liu, Y., Y. Xiao, and Z. Li. 2011. P2X7 receptor positively regulates MyD88-dependent NF-kappaB activation. *Cytokine*. 55:229-236.
- Locovei, S., E. Scemes, F. Qiu, D.C. Spray, and G. Dahl. 2007. Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. *FEBS Lett*. 581:483-488.
- Loetscher, P., B. Moser, and M. Baggolini. 2000. Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Advances in immunology*. 74:127-180.
- Lopez, P.F., H.E. Grossniklaus, H.M. Lambert, T.M. Aaberg, A. Capone, Jr., P. Sternberg, Jr., and N. L'Hernault. 1991. Pathologic features of surgically excised subretinal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 112:647-656.
- Luhmann, U.F., C.A. Lange, S. Robbie, P.M. Munro, J.A. Cowing, H.E. Armer, V. Luong, L.S. Carvalho, R.E. McLaren, F.W. Fitzke, J.W. Bainbridge, and R.R. Ali. 2012. Differential modulation of retinal degeneration by Ccl2 and Cx3cr1 chemokine signalling. *PLoS One*. 7:e35551.

- Luhmann, U.F., S. Robbie, P.M. Munro, S.E. Barker, Y. Duran, V. Luong, F.W. Fitzke, J. Bainbridge, R.R. Ali, and R. Maclarens. 2009. The drusen-like phenotype in aging Ccl2 knockout mice is caused by an accelerated accumulation of swollen autofluorescent subretinal macrophages. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
- Lynch, M.A. 2009. The multifaceted profile of activated microglia. *Molecular neurobiology*. 40:139-156.
- Ma, W., L. Zhao, A.M. Fontainhas, R.N. Fariss, and W.T. Wong. 2009. Microglia in the mouse retina alter the structure and function of retinal pigmented epithelial cells: a potential cellular interaction relevant to AMD. *PLoS One*. 4:e7945.
- MacKenzie, A., H.L. Wilson, E. Kiss-Toth, S.K. Dower, R.A. North, and A. Surprenant. 2001. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity*. 15:825-835.
- Madeira, M.H., R. Boia, P.F. Santos, A.F. Ambrosio, and A.R. Santiago. 2015. Contribution of microglia-mediated neuroinflammation to retinal degenerative diseases. *Mediators Inflamm*. 2015:673090.
- Magnusson, K.P., S. Duan, H. Sigurdsson, H. Petursson, Z. Yang, Y. Zhao, P.S. Bernstein, J. Ge, F. Jonasson, E. Stefansson, G. Helgadottir, N.A. Zabriskie, T. Jonsson, A. Bjornsson, T. Thorlacius, P.V. Jonsson, G. Thorleifsson, A. Kong, H. Stefansson, K. Zhang, K. Stefansson, and J.R. Gulcher. 2006. CFH Y402H confers similar risk of soft drusen and both forms of advanced AMD. *PLoS Med*. 3:e5.
- Mahley, R.W., and S.C. Rall, Jr. 2000. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 1:507-537.
- Makarenkova, H.P., and V.I. Shestopalov. 2014. The role of pannexin hemichannels in inflammation and regeneration. *Frontiers in physiology*. 5:63.
- Mangan, D.F., G.R. Welch, and S.M. Wahl. 1991. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and IL-1 beta prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. *J Immunol*. 146:1541-1546.
- Mantovani, A., A. Sica, and M. Locati. 2005. Macrophage polarization comes of age. *Immunity*. 23:344-346.
- Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*. 25:677-686.
- Mantovani, A., S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena, and A. Sica. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*. 23:549-555.
- March, C.J., B. Mosley, A. Larsen, D.P. Cerretti, G. Braedt, V. Price, S. Gillis, C.S. Henney, S.R. Kronheim, K. Grabstein, and et al. 1985. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature*. 315:641-647.
- Mariathasan, S., and D.M. Monack. 2007. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nature reviews. Immunology*. 7:31-40.
- Mariathasan, S., D.S. Weiss, K. Newton, J. McBride, K. O'Rourke, M. Roose-Girma, W.P. Lee, Y. Weinrauch, D.M. Monack, and V.M. Dixit. 2006. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*. 440:228-232.
- Martinez, F.O., and S. Gordon. 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports*. 6:13.
- Martinez, F.O., A. Sica, A. Mantovani, and M. Locati. 2008. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 13:453-461.
- Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp. 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell*. 10:417-426.
- Marucha, P.T., R.A. Zeff, and D.L. Kreutzer. 1990. Cytokine regulation of IL-1 beta gene expression in the human polymorphonuclear leukocyte. *J Immunol*. 145:2932-2937.
- Mattapallil, M.J., E.F. Wawrousek, C.C. Chan, H. Zhao, J. Roychoudhury, T.A. Ferguson, and R.R. Caspi. 2012. The Rd8 mutation of the Crb1 gene is present in vendor lines of C57BL/6N mice and embryonic stem cells, and confounds ocular induced mutant phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 53:2921-2927.

- McCoy, M.K., and M.G. Tansey. 2008. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation*. 5:45.
- McHarg, S., S.J. Clark, A.J. Day, and P.N. Bishop. 2015. Age-related macular degeneration and the role of the complement system. *Mol Immunol*. 67:43-50.
- McKay, G.J., C.C. Patterson, U. Chakravarthy, S. Dasari, C.C. Klaver, J.R. Vingerling, L. Ho, P.T. de Jong, A.E. Fletcher, I.S. Young, J.H. Seland, M. Rahu, G. Soubrane, L. Tomazzoli, F. Topouzis, J. Vioque, A.D. Hingorani, R. Sofat, M. Dean, J. Sawitzke, J.M. Seddon, I. Peter, A.R. Webster, A.T. Moore, J.R. Yates, V. Cipriani, L.G. Fritsche, B.H. Weber, C.N. Keilhauer, A.J. Lotery, S. Ennis, M.L. Klein, P.J. Francis, D. Stambolian, A. Orlin, M.B. Gorin, D.E. Weeks, C.L. Kuo, A. Swaroop, M. Othman, A. Kanda, W. Chen, G.R. Abecasis, A.F. Wright, C. Hayward, P.N. Baird, R.H. Guymer, J. Attia, A. Thakkinstian, and G. Silvestri. 2011. Evidence of association of APOE with age-related macular degeneration: a pooled analysis of 15 studies. *Hum Mutat*. 32:1407-1416.
- McLaren, J.W. 2009. Measurement of aqueous humor flow. *Exp Eye Res*. 88:641-647.
- McLeod, D.S., M. Taomoto, T. Otsuji, W.R. Green, J.S. Sunness, and G.A. Lutty. 2002. Quantifying changes in RPE and choroidal vasculature in eyes with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43:1986-1993.
- Meleth, A.D., E. Agron, C.C. Chan, G.F. Reed, K. Arora, G. Byrnes, K.G. Csaky, F.L. Ferris, 3rd, and E.Y. Chew. 2005. Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 46:4295-4301.
- Miceli, M.V., M.R. Liles, and D.A. Newsome. 1994. Evaluation of oxidative processes in human pigment epithelial cells associated with retinal outer segment phagocytosis. *Exp Cell Res*. 214:242-249.
- Middleton, J., A.M. Patterson, L. Gardner, C. Schmutz, and B.A. Ashton. 2002. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood*. 100:3853-3860.
- Miller, J.W. 2013. Age-related macular degeneration revisited--piecing the puzzle: the LXIX Edward Jackson memorial lecture. *Am J Ophthalmol*. 155:1-35 e13.
- Mizuno, T., J. Kawanokuchi, K. Numata, and A. Suzumura. 2003. Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. *Brain Res*. 979:65-70.
- Monif, M., C.A. Reid, K.L. Powell, M.L. Smart, and D.A. Williams. 2009. The P2X7 receptor drives microglial activation and proliferation: a trophic role for P2X7R pore. *J Neurosci*. 29:3781-3791.
- Morcos, Y., M.J. Hosie, H.C. Bauer, and T. Chan-Ling. 2001. Immunolocalization of occludin and claudin-1 to tight junctions in intact CNS vessels of mammalian retina. *Journal of neurocytology*. 30:107-123.
- Mosley, K., and M.L. Cuzner. 1996. Receptor-mediated phagocytosis of myelin by macrophages and microglia: effect of opsonization and receptor blocking agents. *Neurochem Res*. 21:481-487.
- Mosser, D.M., and E. Handman. 1992. Treatment of murine macrophages with interferon-gamma inhibits their ability to bind leishmania promastigotes. *J Leukoc Biol*. 52:369-376.
- Muehlhoefer, A., L.J. Saubermann, X. Gu, K. Luedtke-Heckenkamp, R. Xavier, R.S. Blumberg, D.K. Podolsky, R.P. MacDermott, and H.C. Reinecker. 2000. Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa. *J Immunol*. 164:3368-3376.
- Murdaugh, L.S., S. Mandal, A.E. Dill, J. Dillon, J.D. Simon, and E.R. Gaillard. 2011. Compositional studies of human RPE lipofuscin: mechanisms of molecular modifications. *Journal of mass spectrometry : JMS*. 46:90-95.
- Naert, G., and S. Rivest. 2011. CC chemokine receptor 2 deficiency aggravates cognitive impairments and amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 31:6208-6220.

- Nahrendorf, M., F.K. Swirski, E. Aikawa, L. Stangenberg, T. Wurdinger, J.L. Figueiredo, P. Libby, R. Weissleder, and M.J. Pittet. 2007. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med.* 204:3037-3047.
- Naithani, P., N. Vashisht, S. Khanduja, S. Sinha, and S. Garg. 2011. Brilliant blue G-assisted peeling of the internal limiting membrane in macular hole surgery. *Indian journal of ophthalmology.* 59:158-160.
- Nakahira, K., J.A. Haspel, V.A. Rathinam, S.J. Lee, T. Dolinay, H.C. Lam, J.A. Englert, M. Rabinovitch, M. Cernadas, H.P. Kim, K.A. Fitzgerald, S.W. Ryter, and A.M. Choi. 2011. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol.* 12:222-230.
- Nakai, M., T. Kawamata, T. Taniguchi, K. Maeda, and C. Tanaka. 1996. Expression of apolipoprotein E mRNA in rat microglia. *Neurosci Lett.* 211:41-44.
- Nakazawa, T., T. Hisatomi, C. Nakazawa, K. Noda, K. Maruyama, H. She, A. Matsubara, S. Miyahara, S. Nakao, Y. Yin, L. Benowitz, A. Hafezi-Moghadam, and J.W. Miller. 2007. Monocyte chemoattractant protein 1 mediates retinal detachment-induced photoreceptor apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:2425-2430.
- Nakazawa, T., M. Kayama, M. Ryu, H. Kunikata, R. Watanabe, M. Yasuda, J. Kinugawa, D. Vavvas, and J.W. Miller. 2011. Tumor necrosis factor-alpha mediates photoreceptor death in a rodent model of retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52:1384-1391.
- Neelam, K., J. Nolan, U. Chakravarthy, and S. Beatty. 2009. Psychophysical function in age-related maculopathy. *Surv Ophthalmol.* 54:167-210.
- Nelson, D.W., R.J. Gregg, M.E. Kort, A. Perez-Medrano, E.A. Voight, Y. Wang, G. Grayson, M.T. Namovic, D.L. Donnelly-Roberts, W. Niforatos, P. Honore, M.F. Jarvis, C.R. Faltynek, and W.A. Carroll. 2006. Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists. *J Med Chem.* 49:3659-3666.
- Netea, M.G., C.A. Nold-Petry, M.F. Nold, L.A. Joosten, B. Opitz, J.H. van der Meer, F.L. van de Veerdonk, G. Ferwerda, B. Heinhuis, I. Devesa, C.J. Funk, R.J. Mason, B.J. Kullberg, A. Rubartelli, J.W. van der Meer, and C.A. Dinarello. 2009. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood.* 113:2324-2335.
- Ng, T.F., N. Kitaichi, and A.W. Taylor. 2007. In vitro generated autoimmune regulatory T cells enhance intravitreous allogeneic retinal graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48:5112-5117.
- Ng, T.F., B. Turpie, and S. Masli. 2009. Thrombospondin-1-mediated regulation of microglia activation after retinal injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50:5472-5478.
- Nichols, B.A., D.F. Bainton, and M.G. Farquhar. 1971. Differentiation of monocytes. Origin, nature, and fate of their azurophil granules. *J Cell Biol.* 50:498-515.
- Nikodemova, M., I.D. Duncan, and J.J. Watters. 2006. Minocycline exerts inhibitory effects on multiple mitogen-activated protein kinases and IkappaBalpha degradation in a stimulus-specific manner in microglia. *J Neurochem.* 96:314-323.
- Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 308:1314-1318.
- Nishimura, M., H. Umehara, T. Nakayama, O. Yoneda, K. Hieshima, M. Kakizaki, N. Dohmae, O. Yoshie, and T. Imai. 2002. Dual functions of fractalkine/CX3C ligand 1 in trafficking of perforin+/granzyme B+ cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX3CR1 expression. *J Immunol.* 168:6173-6180.
- Nishimura, T., R. Goodnight, R.A. Prendergast, and S.J. Ryan. 1990. Activated macrophages in experimental subretinal neovascularization. *Ophthalmologica.* 200:39-44.

- Niyadurupola, N., P. Sidaway, N. Ma, J.D. Rhodes, D.C. Broadway, and J. Sanderson. 2013. P2X7 receptor activation mediates retinal ganglion cell death in a human retina model of ischemic neurodegeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54:2163-2170.
- Njie, E.G., E. Boelen, F.R. Stassen, H.W. Steinbusch, D.R. Borchelt, and W.J. Streit. 2012. Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. *Neurobiol Aging.* 33:195 e191-112.
- North, R.A. 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews.* 82:1013-1067.
- Notomi, S., T. Hisatomi, Y. Murakami, H. Terasaki, S. Sonoda, R. Asato, A. Takeda, Y. Ikeda, H. Enaida, T. Sakamoto, and T. Ishibashi. 2011. Dynamic increase in extracellular ATP accelerates photoreceptor cell apoptosis via ligation of P2RX7 in subretinal hemorrhage. *PLoS One.* 8:e53338.
- Notomi, S., T. Hisatomi, Y. Murakami, H. Terasaki, S. Sonoda, R. Asato, A. Takeda, Y. Ikeda, H. Enaida, T. Sakamoto, and T. Ishibashi. 2013. Dynamic increase in extracellular ATP accelerates photoreceptor cell apoptosis via ligation of P2RX7 in subretinal hemorrhage. *PLoS One.* 8:e53338.
- Oh, H., H. Takagi, C. Takagi, K. Suzuma, A. Otani, K. Ishida, M. Matsumura, Y. Ogura, and Y. Honda. 1999. The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40:1891-1898.
- Okubo, A., R.H. Rosa, Jr., C.V. Bunce, R.A. Alexander, J.T. Fan, A.C. Bird, and P.J. Luthert. 1999. The relationships of age changes in retinal pigment epithelium and Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40:443-449.
- Olson, J.K., A.M. Girvin, and S.D. Miller. 2001. Direct activation of innate and antigen-presenting functions of microglia following infection with Theiler's virus. *J Virol.* 75:9780-9789.
- Osawa, M., K. Hanada, H. Hamada, and H. Nakauchi. 1996. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science.* 273:242-245.
- Parier, V., and G. Soubrane. 2008. [Age-related macular degeneration]. *Rev Med Interne.* 29:215-223.
- Parmeggiani, F., M.R. Romano, C. Costagliola, F. Semeraro, C. Incorvaia, S. D'Angelo, P. Perri, P. De Palma, K. De Nadai, and A. Sebastiani. 2012. Mechanism of inflammation in age-related macular degeneration. *Mediators Inflamm.* 2012:546786.
- Parvathenani, L.K., S. Tertyshnikova, C.R. Greco, S.B. Roberts, B. Robertson, and R. Posmantur. 2003. P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 278:13309-13317.
- Pasare, C., and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect.* 6:1382-1387.
- Pascual, O., S. Ben Achour, P. Rostaing, A. Triller, and A. Bessis. 2012. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:E197-205.
- Passlick, B., D. Flieger, and H.W. Ziegler-Heitbrock. 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood.* 74:2527-2534.
- Patel, M., and C.C. Chan. 2008. Immunopathological aspects of age-related macular degeneration. *Semin Immunopathol.* 30:97-110.
- Pelegrin, P., and A. Surprenant. 2006. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* 25:5071-5082.
- Peng, W., M.L. Cotrina, X. Han, H. Yu, L. Bekar, L. Blum, T. Takano, G.F. Tian, S.A. Goldman, and M. Nedergaard. 2009. Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:12489-12493.
- Pennell, N.A., and W.J. Streit. 1997. Colonization of neural allografts by host microglial cells: relationship to graft neovascularization. *Cell Transplant.* 6:221-230.

- Piccioli, P., and A. Rubartelli. 2013. The secretion of IL-1beta and options for release. *Seminars in immunology*. 25:425-429.
- Pott Godoy, M.C., R. Tarelli, C.C. Ferrari, M.I. Sarchi, and F.J. Pitossi. 2008. Central and systemic IL-1 exacerbates neurodegeneration and motor symptoms in a model of Parkinson's disease. *Brain*. 131:1880-1894.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al., editors. Neuroscience. 2<sup>nd</sup> edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001.
- Puthusser, T., and E. Fletcher. 2009. Extracellular ATP induces retinal photoreceptor apoptosis through activation of purinoceptors in rodents. *J Comp Neurol*. 513:430-440.
- Qu, Y., L. Franchi, G. Nunez, and G.R. Dubyak. 2007. Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol*. 179:1913-1925.
- Ramrattan, R.S., T.L. van der Schaft, C.M. Mooy, W.C. de Brujin, P.G. Mulder, and P.T. de Jong. 1994. Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 35:2857-2864.
- Ransohoff, R.M. 2009. Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity*. 31:711-721.
- Ransohoff, R.M., and A.E. Cardona. 2010. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*. 468:253-262.
- Rassendren, F., G. Buell, A. Newbolt, R.A. North, and A. Surprenant. 1997. Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *EMBO J*. 16:3446-3454.
- Reed-Geaghan, E.G., Q.W. Reed, P.E. Cramer, and G.E. Landreth. 2010. Deletion of CD14 attenuates Alzheimer's disease pathology by influencing the brain's inflammatory milieu. *J Neurosci*. 30:15369-15373.
- Reichert, F., and S. Rotshenker. 2003. Complement-receptor-3 and scavenger-receptor-AI/II mediated myelin phagocytosis in microglia and macrophages. *Neurobiol Dis*. 12:65-72.
- Relton, J.K., and N.J. Rothwell. 1992. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. *Brain Res Bull*. 29:243-246.
- Rider, P., Y. Carmi, O. Guttman, A. Braiman, I. Cohen, E. Voronov, M.R. White, C.A. Dinarello, and R.N. Apte. 2011. IL-1alpha and IL-1beta recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *J Immunol*. 187:4835-4843.
- Rider, P., Y. Carmi, E. Voronov, and R.N. Apte. 2013. Interleukin-1alpha. *Seminars in immunology*. 25:430-438.
- Rigato, C., N. Swinnen, R. Buckinx, I. Couillin, J.M. Mangin, J.M. Rigo, P. Legendre, and H. Le Corronc. 2012. Microglia proliferation is controlled by P2X7 receptors in a Pannexin-1-independent manner during early embryonic spinal cord invasion. *J Neurosci*. 32:11559-11573.
- Rivera, A., S.A. Fisher, L.G. Fritsche, C.N. Keilhauer, P. Lichtner, T. Meitinger, and B.H. Weber. 2005. Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum Mol Genet*. 14:3227-3236.
- Robson, S.C., J. Sevigny, and H. Zimmermann. 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic signalling*. 2:409-430.
- Rock, R.B., G. Gekker, S. Hu, W.S. Sheng, M. Cheoran, J.R. Lokensgard, and P.K. Peterson. 2004. Role of microglia in central nervous system infections. *Clinical microbiology reviews*. 17:942-964, table of contents.
- Rosenfeld, P.J., D.M. Brown, J.S. Heier, D.S. Boyer, P.K. Kaiser, C.Y. Chung, R.Y. Kim, and M.S. Group. 2006. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 355:1419-1431.

- Rossi, D.L., G. Hardiman, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N. Jenkins, A. Zlotnik, and J.F. Bazan. 1998. Cloning and characterization of a new type of mouse chemokine. *Genomics*. 47:163-170.
- Rostene, W., A. Guyon, L. Kular, D. Godefroy, F. Barbieri, A. Bajetto, G. Banisadr, C. Callewaere, G. Conductier, C. Rovere, S. Melik-Parsadaniantz, and T. Florio. 2011. Chemokines and chemokine receptors: new actors in neuroendocrine regulations. *Front Neuroendocrinol*. 32:10-24.
- Rotshenker, S. 2003. Microglia and macrophage activation and the regulation of complement-receptor-3 (CR3/MAC-1)-mediated myelin phagocytosis in injury and disease. *J Mol Neurosci*. 21:65-72.
- Ryu, J.K., and J.G. McLarnon. 2008. Block of purinergic P2X(7) receptor is neuroprotective in an animal model of Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 19:1715-1719.
- Saijo, K., and C.K. Glass. 2011. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nature reviews. Immunology*. 11:775-787.
- Saint-Geniez, M., T. Kurihara, E. Sekiyama, A.E. Maldonado, and P.A. D'Amore. 2009. An essential role for RPE-derived soluble VEGF in the maintenance of the choriocapillaris. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:18751-18756.
- Sakurai, E., A. Anand, B.K. Ambati, N. van Rooijen, and J. Ambati. 2003. Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 44:3578-3585.
- Santiago, A.R., F.I. Baptista, P.F. Santos, G. Cristovao, A.F. Ambrosio, R.A. Cunha, and C.A. Gomes. 2014. Role of microglia adenosine A(2A) receptors in retinal and brain neurodegenerative diseases. *Mediators Inflamm*. 2014:465694.
- Santos, A.M., R. Calvente, M. Tassi, M.C. Carrasco, D. Martin-Oliva, J.L. Marin-Teva, J. Navascues, and M.A. Cuadros. 2008. Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J Comp Neurol*. 506:224-239.
- Sanz, J.M., and F. Di Virgilio. 2000. Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells. *J Immunol*. 164:4893-4898.
- Sarks, J.P., S.H. Sarks, and M.C. Killingsworth. 1988. Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium. *Eye (Lond)*. 2 ( Pt 5):552-577.
- Sarks, S.H., J.J. Arnold, M.C. Killingsworth, and J.P. Sarks. 1999. Early drusen formation in the normal and aging eye and their relation to age related maculopathy: a clinicopathological study. *Br J Ophthalmol*. 83:358-368.
- Saunders, B.M., S.L. Fernando, R. Sluyter, W.J. Britton, and J.S. Wiley. 2003. A loss-of-function polymorphism in the human P2X7 receptor abolishes ATP-mediated killing of mycobacteria. *J Immunol*. 171:5442-5446.
- Schachat, A.P., L. Hyman, M.C. Leske, A.M. Connell, and S.Y. Wu. 1995. Features of age-related macular degeneration in a black population. The Barbados Eye Study Group. *Arch Ophthalmol*. 113:728-735.
- Schaumberg, D.A., W.G. Christen, J.E. Buring, R.J. Glynn, N. Rifai, and P.M. Ridker. 2007. High-sensitivity C-reactive protein, other markers of inflammation, and the incidence of macular degeneration in women. *Arch Ophthalmol*. 125:300-305.
- Schaumberg, D.A., W.G. Christen, S.E. Hankinson, and R.J. Glynn. 2001. Body mass index and the incidence of visually significant age-related maculopathy in men. *Arch Ophthalmol*. 119:1259-1265.
- Scholl, H.P., M. Fleckenstein, P. Charbel Issa, C. Keilhauer, F.G. Holz, and B.H. Weber. 2007. An update on the genetics of age-related macular degeneration. *Mol Vis*. 13:196-205.
- Schroder, K., and J. Tschopp. 2010. The inflammasomes. *Cell*. 140:821-832.
- Seddon, J.M., G. Gensler, R.C. Milton, M.L. Klein, and N. Rifai. 2004. Association between C-reactive protein and age-related macular degeneration. *JAMA*. 291:704-710.
- Seddon, J.M., S. George, B. Rosner, and N. Rifai. 2005. Progression of age-related macular degeneration: prospective assessment of C-reactive protein, interleukin 6, and other cardiovascular biomarkers. *Arch Ophthalmol*. 123:774-782.

- Seddon, J.M., Y. Yu, E.C. Miller, R. Reynolds, P.L. Tan, S. Gowrisankar, J.I. Goldstein, M. Triebwasser, H.E. Anderson, J. Zerbib, D. Kavanagh, E. Souied, N. Katsanis, M.J. Daly, J.P. Atkinson, and S. Raychaudhuri. 2013. Rare variants in CFI, C3 and C9 are associated with high risk of advanced age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 45:1366-1370.
- Sennlaub, F., C. Auvynet, B. Calippe, S. Lavalette, L. Poupel, S.J. Hu, E. Dominguez, S. Camelo, O. Levy, E. Guyon, N. Saederup, I.F. Charo, N.V. Rooijen, E. Nandrot, J.L. Bourges, F. Behar-Cohen, J.A. Sahel, X. Guillonneau, W. Raoul, and C. Combadiere. 2013. CCR2(+) monocytes infiltrate atrophic lesions in age-related macular disease and mediate photoreceptor degeneration in experimental subretinal inflammation in Cx3cr1 deficient mice. *EMBO Mol Med.* 5:1775-1793.
- Sennlaub, F., Y. Courtois, and O. Goureau. 2002. Inducible nitric oxide synthase mediates retinal apoptosis in ischemic proliferative retinopathy. *J Neurosci.* 22:3987-3993.
- Sepp, T., J.C. Khan, D.A. Thurlby, H. Shahid, D.G. Clayton, A.T. Moore, A.C. Bird, and J.R. Yates. 2006. Complement factor H variant Y402H is a major risk determinant for geographic atrophy and choroidal neovascularization in smokers and nonsmokers. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47:536-540.
- Serbina, N.V., and E.G. Pamer. 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol.* 7:311-317.
- Shaftel, S.S., W.S. Griffin, and M.K. O'Banion. 2008. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *J Neuroinflammation.* 5:7.
- Shemon, A.N., R. Sluyter, S.L. Fernando, A.L. Clarke, L.P. Dao-Ung, K.K. Skarratt, B.M. Saunders, K.S. Tan, B.J. Gu, S.J. Fuller, W.J. Britton, S. Petrou, and J.S. Wiley. 2006. A Thr357 to Ser polymorphism in homozygous and compound heterozygous subjects causes absent or reduced P2X7 function and impairs ATP-induced mycobacterial killing by macrophages. *J Biol Chem.* 281:2079-2086.
- Sheridan, G.K., and K.J. Murphy. 2013. Neuron-glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage. *Open biology.* 3:130181.
- Shi, C., and E.G. Pamer. 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews. Immunology.* 11:762-774.
- Shichi H. Physiological Background. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW. editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 1999.
- Shimada, K., T.R. Crother, J. Karlin, J. Dagvadorj, N. Chiba, S. Chen, V.K. Ramanujan, A.J. Wolf, L. Vergnes, D.M. Ojcius, A. Rentsendorj, M. Vargas, C. Guerrero, Y. Wang, K.A. Fitzgerald, D.M. Underhill, T. Town, and M. Arditi. 2012. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity.* 36:401-414.
- Silverman, W., S. Locovei, and G. Dahl. 2008. Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 295:C761-767.
- Sims, J.E., M.J. Nicklin, J.F. Bazan, J.L. Barton, S.J. Busfield, J.E. Ford, R.A. Kastelein, S. Kumar, H. Lin, J.J. Mulero, J. Pan, Y. Pan, D.E. Smith, and P.R. Young. 2001. A new nomenclature for IL-1-family genes. *Trends in immunology.* 22:536-537.
- Sims, J.E., and D.E. Smith. 2010. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature reviews. Immunology.* 10:89-102.
- Skaper, S.D., L. Facci, A.A. Culbert, N.A. Evans, I. Chessell, J.B. Davis, and J.C. Richardson. 2006. P2X(7) receptors on microglial cells mediate injury to cortical neurons in vitro. *Glia.* 54:234-242.
- Skerka, C., N. Lauer, A.A. Weinberger, C.N. Keilhauer, J. Suhnel, R. Smith, U. Schlotzer-Schrehardt, L. Fritsche, S. Heinen, A. Hartmann, B.H. Weber, and P.F. Zipfel. 2007. Defective complement control of factor H (Y402H) and FHL-1 in age-related macular degeneration. *Mol Immunol.* 44:3398-3406.
- Smart, M.L., B. Gu, R.G. Panchal, J. Wiley, B. Cromer, D.A. Williams, and S. Petrou. 2003. P2X7 receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *J Biol Chem.* 278:8853-8860.

- Soehnlein, O., and L. Lindbom. 2010. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature reviews. Immunology.* 10:427-439.
- Somjen, G.G. 1988. Nervenkitt: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia.* 1:2-9.
- Soubrane, G., and Souied, E (2007). Les DMLAs: Rapport présenté à la société française d'ophtalmologie.
- Souied, E.H., P. Benlian, P. Amouyel, J. Feingold, J.P. Lagarde, A. Munnich, J. Kaplan, G. Coscas, and G. Soubrane. 1998. The epsilon4 allele of the apolipoprotein E gene as a potential protective factor for exudative age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 125:353-359.
- Souied, E.H., N. Leveziel, F. Richard, M.A. Dragon-Durey, G. Coscas, G. Soubrane, P. Benlian, and V. Fremeaux-Bacchi. 2005. Y402H complement factor H polymorphism associated with exudative age-related macular degeneration in the French population. *Mol Vis.* 11:1135-1140.
- Sparrow, J.R., and M. Boulton. 2005. RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Exp Eye Res.* 80:595-606.
- Sperlagh, B., A. Heinrich, and C. Csolle. 2007. P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release-an update. *Purinergic signalling.* 3:269-284.
- Sperlagh, B., E.S. Vizi, K. Wirkner, and P. Illes. 2006. P2X7 receptors in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 78:327-346.
- Springer, T.A. 1995. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annual review of physiology.* 57:827-872.
- Standiford, T.J., S.L. Kunkel, S.H. Phan, B.J. Rollins, and R.M. Strieter. 1991. Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J Biol Chem.* 266:9912-9918.
- Stansfield, B.K., and D.A. Ingram. 2015. Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clinical and translational medicine.* 4:5.
- Stein-Streilein, J. 2008. Immune regulation and the eye. *Trends in immunology.* 29:548-554.
- Stein-Streilein, J. 2013. Mechanisms of immune privilege in the posterior eye. *International reviews of immunology.* 32:42-56.
- Stoll, G., S. Jander, and M. Schroeter. 1998. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol.* 56:149-171.
- Strauss, O. 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological reviews.* 85:845-881.
- Strauss-Ayali, D., S.M. Conrad, and D.M. Mosser. 2007. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol.* 82:244-252.
- Streilein, J.W., N. Ma, H. Wenkel, T.F. Ng, and P. Zamiri. 2002. Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Res.* 42:487-495.
- Streit, W.J. 2002a. Microglia and the response to brain injury. *Ernst Schering Research Foundation workshop:*11-24.
- Streit, W.J. 2002b. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia.* 40:133-139.
- Streit, W.J., N.W. Sammons, A.J. Kuhns, and D.L. Sparks. 2004. Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia.* 45:208-212.
- Streit, W.J., S.A. Walter, and N.A. Pennell. 1999. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol.* 57:563-581.
- Sugiyama, T., H. Oku, M. Shibata, M. Fukuhara, H. Yoshida, and T. Ikeda. 2010. Involvement of P2X7 receptors in the hypoxia-induced death of rat retinal neurons. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51:3236-3243.
- Sun, C., J. Chu, S. Singh, and R.D. Salter. 2010. Identification and characterization of a novel variant of the human P2X(7) receptor resulting in gain of function. *Purinergic signalling.* 6:31-45.
- Sunderkotter, C., T. Nikolic, M.J. Dillon, N. Van Rooijen, M. Stehling, D.A. Drevets, and P.J. Leenen. 2004. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol.* 172:4410-4417.

- Sutterwala, F.S., S. Haasken, and S.L. Cassel. 2014. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann N Y Acad Sci.* 1319:82-95.
- Swirski, F.K., M. Nahrendorf, M. Etzrodt, M. Wildgruber, V. Cortez-Retamozo, P. Panizzi, J.L. Figueiredo, R.H. Kohler, A. Chudnovskiy, P. Waterman, E. Aikawa, T.R. Mempel, P. Libby, R. Weissleder, and M.J. Pittet. 2009. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science.* 325:612-616.
- Takahashi, K., M. Prinz, M. Stagi, O. Chechneva, and H. Neumann. 2007. TREM2-transduced myeloid precursors mediate nervous tissue debris clearance and facilitate recovery in an animal model of multiple sclerosis. *PLoS Med.* 4:e124.
- Tanaka, R., M. Komine-Kobayashi, H. Mochizuki, M. Yamada, T. Furuya, M. Migita, T. Shimada, Y. Mizuno, and T. Urabe. 2003. Migration of enhanced green fluorescent protein expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mouse brain following permanent focal ischemia. *Neuroscience.* 117:531-539.
- Tarallo, V., Y. Hirano, B.D. Gelfand, S. Dridi, N. Kerur, Y. Kim, W.G. Cho, H. Kaneko, B.J. Fowler, S. Bogdanovich, R.J. Albuquerque, W.W. Hauswirth, V.A. Chiodo, J.F. Kugel, J.A. Goodrich, S.L. Ponicsan, G. Chaudhuri, M.P. Murphy, J.L. Dunaeif, B.K. Ambati, Y. Ogura, J.W. Yoo, D.K. Lee, P. Provost, D.R. Hinton, G. Nunez, J.Z. Baffi, M.E. Kleinman, and J. Ambati. 2012. DICER1 loss and Alu RNA induce age-related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88. *Cell.* 149:847-859.
- Taylor, A. 2003. A review of the influence of aqueous humor on immunity. *Ocul Immunol Inflamm.* 11:231-241.
- Taylor, A.W. 2007. Ocular immunosuppressive microenvironment. *Chemical immunology and allergy.* 92:71-85.
- Taylor, H.R., S. West, B. Munoz, F.S. Rosenthal, S.B. Bressler, and N.M. Bressler. 1992. The long-term effects of visible light on the eye. *Arch Ophthalmol.* 110:99-104.
- Telander, D.G. 2011. Inflammation and age-related macular degeneration (AMD). *Seminars in ophthalmology.* 26:192-197.
- Thelen, M. 2001. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol.* 2:129-134.
- Troutbeck, R., S. Al-Qureshi, and R.H. Guymer. 2012. Therapeutic targeting of the complement system in age-related macular degeneration: a review. *Clinical & experimental ophthalmology.* 40:18-26.
- Tschopp, J., and K. Schroder. 2010. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nature reviews. Immunology.* 10:210-215.
- Tseng, W.A., T. Thein, K. Kinnunen, K. Lashkari, M.S. Gregory, P.A. D'Amore, and B.R. Ksander. 2013. NLRP3 inflammasome activation in retinal pigment epithelial cells by lysosomal destabilization: implications for age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54:110-120.
- Tsou, C.L., C.A. Haskell, and I.F. Charo. 2001. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine. *J Biol Chem.* 276:44622-44626.
- Tsoumakidou, M., I.K. Demedts, G.G. Brusselle, and P.K. Jeffery. 2008. Dendritic cells in chronic obstructive pulmonary disease: new players in an old game. *Am J Respir Crit Care Med.* 177:1180-1186.
- Tuo, J., C.M. Bojanowski, M. Zhou, D. Shen, R.J. Ross, K.I. Rosenberg, D.J. Cameron, C. Yin, J.A. Kowalak, Z. Zhuang, K. Zhang, and C.C. Chan. 2007. Murine ccl2/cx3cr1 deficiency results in retinal lesions mimicking human age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48:3827-3836.
- Udagawa, N., N. Takahashi, T. Akatsu, H. Tanaka, T. Sasaki, T. Nishihara, T. Koga, T.J. Martin, and T. Suda. 1990. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:7260-7264.
- Vallier, L., and P.E. Sawchenko. 2003. Bone marrow-derived cells that populate the adult mouse brain preserve their hematopoietic identity. *J Neurosci.* 23:5197-5207.

- Van Coillie, E., J. Van Damme, and G. Opdenakker. 1999. The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 10:61-86.
- Vande Walle, L., N. Van Opdenbosch, P. Jacques, A. Fossoul, E. Verheugen, P. Vogel, R. Beyaert, D. Elewaut, T.D. Kanneganti, G. van Loo, and M. Lamkanfi. 2014. Negative regulation of the NLRP3 inflammasome by A20 protects against arthritis. *Nature.* 512:69-73.
- VanNewkirk, M.R., M.B. Nanjan, J.J. Wang, P. Mitchell, H.R. Taylor, and C.A. McCarty. 2000. The prevalence of age-related maculopathy: the visual impairment project. *Ophthalmology.* 107:1593-1600.
- Villani, A.C., M. Lemire, G. Fortin, E. Louis, M.S. Silverberg, C. Collette, N. Baba, C. Libioulle, J. Belaiche, A. Bitton, D. Gaudet, A. Cohen, D. Langelier, P.R. Fortin, J.E. Wither, M. Sarfati, P. Rutgeerts, J.D. Rioux, S. Vermeire, T.J. Hudson, and D. Franchimont. 2009. Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet.* 41:71-76.
- Vingerling, J.R., I. Dieleman, M.L. Bots, A. Hofman, D.E. Grobbee, and P.T. de Jong. 1995. Age-related macular degeneration is associated with atherosclerosis. The Rotterdam Study. *Am J Epidemiol.* 142:404-409.
- Vingerling, J.R., A. Hofman, D.E. Grobbee, and P.T. de Jong. 1996. Age-related macular degeneration and smoking. The Rotterdam Study. *Arch Ophthalmol.* 114:1193-1196.
- Virginio, C., D. Church, R.A. North, and A. Surprenant. 1997. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology.* 36:1285-1294.
- von Bernhardi, R., J.E. Tichauer, and J. Eugenin. 2010. Aging-dependent changes of microglial cells and their relevance for neurodegenerative disorders. *J Neurochem.* 112:1099-1114.
- Walsh, J.G., D.A. Muruve, and C. Power. 2014. Inflammasomes in the CNS. *Nat Rev Neurosci.* 15:84-97.
- Wang, J., M. Ma, S. Locovei, R.W. Keane, and G. Dahl. 2007. Modulation of membrane channel currents by gap junction protein mimetic peptides: size matters. *Am J Physiol Cell Physiol.* 293:C1112-1119.
- Wassle, H., L. Heinze, E. Ivanova, S. Majumdar, J. Weiss, R.J. Harvey, and S. Haverkamp. 2009. Glycinergic transmission in the Mammalian retina. *Frontiers in molecular neuroscience.* 2:6.
- Weber, A., P. Wasiliew, and M. Kracht. 2010. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Science signaling.* 3:cm1.
- Wewers, M.D., and A. Sarkar. 2009. P2X(7) receptor and macrophage function. *Purinergic signalling.* 5:189-195.
- Wielgus, A.R., R.J. Collier, E. Martin, F.B. Lih, K.B. Tomer, C.F. Chignell, and J.E. Roberts. 2010. Blue light induced A2E oxidation in rat eyes--experimental animal model of dry AMD. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology.* 9:1505-1512.
- Wilson, K.P., J.A. Black, J.A. Thomson, E.E. Kim, J.P. Griffith, M.A. Navia, M.A. Murcko, S.P. Chambers, R.A. Aldape, S.A. Raybuck, and et al. 1994. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature.* 370:270-275.
- Winkler, B.S., M.J. Arnold, M.A. Brassell, and D.G. Puro. 2000. Energy metabolism in human retinal Muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41:3183-3190.
- Wittmann, M., S.R. Kingsbury, and M.F. McDermott. 2011. Is caspase 1 central to activation of interleukin-1? *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme.* 78:327-330.
- Wong-Riley, M.T. 2010. Energy metabolism of the visual system. *Eye and brain.* 2:99-116.
- Xu, H., M. Chen, and J.V. Forrester. 2009. Para-inflammation in the aging retina. *Prog Retin Eye Res.* 28:348-368.
- Xu, H., M. Chen, A. Manivannan, N. Lois, and J.V. Forrester. 2008. Age-dependent accumulation of lipofuscin in perivascular and subretinal microglia in experimental mice. *Aging Cell.* 7:58-68.

- Xu, H., M. Chen, E.J. Mayer, J.V. Forrester, and A.D. Dick. 2007. Turnover of resident retinal microglia in the normal adult mouse. *Glia*. 55:1189-1198.
- Xu, H., R. Dawson, I.J. Crane, and J. Liversidge. 2005. Leukocyte diapedesis in vivo induces transient loss of tight junction protein at the blood-retina barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 46:2487-2494.
- Xu, X.J., M. Boumechache, L.E. Robinson, V. Marschall, D.C. Gorecki, M. Masin, and R.D. Murrell-Lagnado. 2012. Splice variants of the P2X7 receptor reveal differential agonist dependence and functional coupling with pannexin-1. *J Cell Sci*. 125:3776-3789.
- Yang, X.L. 2004. Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Prog Neurobiol*. 73:127-150.
- Yang, Z., N.J. Camp, H. Sun, Z. Tong, D. Gibbs, D.J. Cameron, H. Chen, Y. Zhao, E. Pearson, X. Li, J. Chien, A. Dewan, J. Harmon, P.S. Bernstein, V. Shridhar, N.A. Zabriskie, J. Hoh, K. Howes, and K. Zhang. 2006. A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science*. 314:992-993.
- Yenari, M.A., T.M. Kauppinen, and R.A. Swanson. 2010. Microglial activation in stroke: therapeutic targets. *Neurotherapeutics*. 7:378-391.
- Yiangou, Y., P. Facer, P. Durrenberger, I.P. Chessell, A. Naylor, C. Bountra, R.R. Banati, and P. Anand. 2006. COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC neurology*. 6:12.
- Yip, L., T. Woehrle, R. Corriden, M. Hirsh, Y. Chen, Y. Inoue, V. Ferrari, P.A. Insel, and W.G. Junger. 2009. Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J*. 23:1685-1693.
- Yoshimura, T., E.A. Robinson, S. Tanaka, E. Appella, and E.J. Leonard. 1989. Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *J Immunol*. 142:1956-1962.
- Young, R.W. 1987. Pathophysiology of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*. 31:291-306.
- Yu, Q., Z. Guo, X. Liu, Q. Ouyang, C. He, G. Burnstock, H. Yuan, and Z. Xiang. 2013. Block of P2X7 receptors could partly reverse the delayed neuronal death in area CA1 of the hippocampus after transient global cerebral ischemia. *Purinergic signalling*. 9:663-675.
- Zamiri, P., S. Masli, N. Kitaichi, A.W. Taylor, and J.W. Streilein. 2005. Thrombospondin plays a vital role in the immune privilege of the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 46:908-919.
- Zander, E., and G. Weddell. 1951. Observations on the innervation of the cornea. *J Anat*. 85:68-99.
- Zanier, E.R., F. Marchesi, F. Ortolano, C. Perego, M. Arabian, T. Zoerle, E. Sammali, F. Pischiutta, and M.G. De Simoni. 2015. Fractalkine receptor deficiency is associated with early protection, but late worsening of outcome following brain trauma in mice. *J Neurotrauma*.
- Zareparsi, S., A.C. Reddick, K.E. Branham, K.B. Moore, L. Jessup, S. Thoms, M. Smith-Wheelock, B.M. Yashar, and A. Swaroop. 2004. Association of apolipoprotein E alleles with susceptibility to age-related macular degeneration in a large cohort from a single center. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 45:1306-1310.
- Zerbib, J., N. Puche, F. Richard, N. Leveziel, S.Y. Cohen, J.F. Korobelnik, J. Sahel, A. Munnich, J. Kaplan, J.M. Rozet, and E.H. Souied. 2011. No association between the T280M polymorphism of the CX3CR1 gene and exudative AMD. *Exp Eye Res*. 93:382-386.
- Zhou, R., A. Tardivel, B. Thorens, I. Choi, and J. Tschopp. 2010. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol*. 11:136-140.
- Zhou, R., A.S. Yazdi, P. Menu, and J. Tschopp. 2011. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 469:221-225.

- Zlotnik, A., and O. Yoshie. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 12:121-127.
- Zujovic, V., N. Schussler, D. Jourdain, D. Duverger, and V. Taupin. 2001. In vivo neutralization of endogenous brain fractalkine increases hippocampal TNF $\alpha$  and 8-isoprostanate production induced by intracerebroventricular injection of LPS. *J Neuroimmunol*. 115:135-143.

# **ANNEXES**

**Article 3:** Apolipoprotein E promotes subretinal mononuclear phagocyte survival and chronic inflammation in age-related macular degeneration.

Olivier Levy, Bertrand Calippe, Sophie Lavalette, Shulong J Hu, William Raoul, Elisa Dominguez, Michael Housset, Michel Pâques, José-Alain Sahel, Alexis-Pierre Bemelmans, Christophe Combadiere, Xavier Guillonneau and Florian Sennlaub.

**EMBO Mol Medecine. 2015**

Participation dans l'article:

Figure 3D: Acquisiton et analyse des données

Figure 6I, J et K: Participation à l'acquisition des données

**Article 4:** APOE-isoforms control pathogenic subretinal inflammation in age related macular degeneration.

Olivier Levy, Sophie Lavalette, Shulong J Hu, Michael Housser, William Raoul, Chiara Eandi, José-Alain Sahel, Patrick M. Sullivan, Xavier Guillonneau and Florian Sennlaub.

**Journal of Neuroscience. 2015**

Participation dans l'article:

Figure 1D: Participation à l'acquisition des données

Figure 2: Acquisition et analyse des données

Figure 3A et B: Participation à l'acquisition des données

Figure 4D et E: Participation à l'acquisition des données